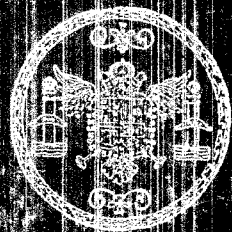


**Universidad de Granada**  
**Facultad de Ciencias**



Factores que condicionan la resistencia a  
la supresividad de las estirpes rho<sup>-</sup> en  
Saccharomyces cerevisiae

**Mercedes Maqueda Abreu**

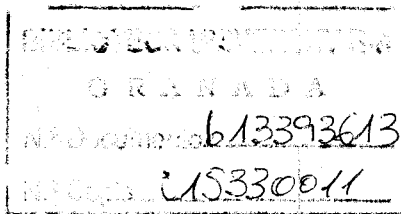
1/5A

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA	
- GRANADA -	
Sede	C
Numero	109
Fecha	30

C

R. 48130

FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA



"FACTORES QUE CONDICIONAN LA RESISTENCIA A LA SUPRESIVIDAD DE LAS ESTIRPES  $\text{RHO}^-$  EN SACCHAROMYCES CEREVISIAE"

MERCEDES MAQUEDA ABREU

UNIVERSIDAD DE GRANADA



"FACTORES QUE CONDICIONAN LA RESISTENCIA A LA  
SUPRESIVIDAD DE LAS ESTIRPES RHO<sup>-</sup> EN SACCHARO-  
MYCES CEREVISIAE "

MEMORIA presentada para aspirar al grado de  
Doctor en Ciencias por la Licenciada D<sup>a</sup>. Mer-  
cedes Maqueda Abreu.

Prof. Dr. D. ENRIQUE MONTOYA GOMEZ

Director de Tesis

Dra. D<sup>a</sup>. MARIA TERESA GONZALEZ MUÑOZ

Co-Directora de Tesis

MERCEDES MAQUEDA ABREU

Aspirante al Grado de Doctor en Ciencias

Granada, Enero de 1.979.

El presente trabajo ha sido realizado en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada durante los años 1975-1978.

La realización del trabajo experimental ha sido sufragada en parte por una beca de Formación de Personal Investigador durante los años 1975, 1976, y 1977.

Parte de los resultados de esta Tesis han sido presentados en el V Congreso de la Sociedad Española de Microbiología, Salamanca, 1975.

Tesis doctoral dirigida por el Prof. Dr. D. Enrique Montoya Gómez, Catedrático de Microbiología de la Universidad de Granada. Fue leída el 31 de enero de 1979, obteniendo la calificación de Sobresaliente "cum laude", ante el Tribunal formado por los profesores Montoya Gómez, Piédrola Angulo, Ramos-Cormenzana, Olivares Pascual y Pretel Martínez.

Mi agradecimiento

Al Director de esta Tesis Doctoral, Prof. Dr. D. Enrique Montoya Gómez, Catedrático de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada, por su constante ayuda y orientación en la realización de este trabajo.

A la Dra. González Muñoz, por sus consejos a lo largo de este trabajo.

Igualmente, quiero dar las gracias a mis compañeros, personal técnico y auxiliar del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada.

INDICE



	<u>Pag.</u>
INTRODUCCION .....	21
PARTE TEORICA .....	26
- Mutantes de levaduras con deficiencia respiratoria .....	28
- Caracteres de los mutantes petites .....	29
- Tipos de mutantes petites .....	31
- Aislamiento y caracterización de los mutantes rho <sup>-</sup> .....	33
- Naturaleza química del factor rho .....	37
- Supresividad .....	42
- Bases moleculares de la supresividad .....	45
MATERIAL Y METODOS .....	49
1. - Microorganismos .....	51
1. 1. - Estirpes haploides de partida de <u>Saccharomyces cerevisiae</u> .....	51
1. 1. 1. - Estirpes derivadas de las anteriormente citadas en el apartado (1. 1) empleadas en la realización del trabajo .....	51
1. 1. 2. - Estirpes haploides rho <sup>+</sup> presentes en cultivos de las estirpes citadas en el apartado(1. 1. 1) .....	52

	<u>Pag.</u>
1. 1. 2. 1. - Estirpes haploides rho <sup>+</sup> presentes en cultivos de las estirpes citadas en el apartado (1. 1. 2.) .....	52
1. 1. 3. - Estirpes rho <sup>-</sup> haploides empleadas .....	53
1. 1. 3. 1. - Obtenidas a partir de mutantes espontáneas .....	53
1. 1. 3. 2. - Obtenidas mediante tratamientos con anaranjado de acridina .....	54
1. 2. - Estirpes rho <sup>+</sup> haploides procedentes de cruces entre estirpes rho <sup>+</sup> y rho <sup>-</sup> .....	54
1. 2. 1. - Progenie haploide rho <sup>+</sup> procedente de seis zigotos obtenidos en cruces entre SER19 y AXp-10 .....	54
1. 2. 2. - Progenie haploide rho <sup>+</sup> procedente de un cruce entre SXg1-31 y AXp-10 .....	55
1. 2. 3. - Progenie haploide rho <sup>+</sup> procedente de un cruce entre SXg4-31 y AXp-10 .....	55
2. - Medios de cultivo .....	56
2. 1. - Medios de conservación y crecimiento .....	56

	<u>Pag.</u>
2. 2. - Medios empleados para la esporulación de levaduras .....	57
2. 2. 1. - Medio de pre-esporulación .....	58
2. 3. - Medio de conjugación .....	58
2. 4. - Medio mínimo de Wickerham .....	59
2. 4. 1. - Variantes empleadas .....	60
3. - Técnicas para la comprobación de los requerimientos nutritivos de estirpes auxótrofas .....	61
3. 1. - Preparación de los medios correspondientes .....	61
3. 2. - Comprobación de los requerimientos nutritivos .....	62
4. - Técnicas empleadas en la obtención y selección de mutantes rho <sup>-</sup> .....	63
4. 1. - Diferenciación y selección de estirpes rho <sup>-</sup> .....	63
4. 1. 1. - Diferenciación por siembra en medio NLG .....	64
4. 1. 2. - Técnica del cloruro de trifenil tetrazolio .....	64
4. 1. 3. - Selección de estirpes rho <sup>-</sup> .....	66



	<u>Pag.</u>
4. 2. - Comprobación de la deficiencia respiratoria y tipo de la misma de estirpes seleccionadas .....	66
5. - Técnicas de cruce entre levaduras haploides y selección de cigotos prototrofos .....	68
5. 1. - Determinación cualitativa de la capacidad de cruce y viabilidad de los cigotos .....	68
5. 2. - Cruce en medio de conjugación líquido .....	69
5. 3. - Técnica de micromanipulación para cruzar levaduras .....	70
5. 3. 1. - Preparación de la cámara de cultivo .....	70
5. 3. 2. - Obtención de las microagujas .....	70
5. 3. 3. - Cruce de estirpes haploides .....	71
5. 3. 4. - Disección de ascas .....	73
6. - Determinación del porcentaje de células rho <sup>-</sup> en cultivos estacionarios de estirpes rho <sup>+</sup> .....	75
7. - Determinación de la frecuencia de mutación espontánea .....	77
8. - Determinación de la supresividad de las estirpes rho <sup>-</sup> .....	78

	<u>Pag.</u>
9. - Esporulaci3n de estirpes diploides y obtenci3n y selecci3n de ascosporas .....	79
9.1. - Esporulaci3n .....	79
9.2. - Rotura de las ascas y obtenci3n de las ascosporas .....	80
9.3. - Selecci3n de estirpes haploides a partir de las ascosporas .....	80
10. - Comprobaci3n del car3cter haploide o diploide de una estirpe .....	82
11. - Curvas de crecimiento de las estirpes haploides en <u>S. cerevisiae</u> .....	83
 EXPERIENCIAS Y RESULTADOS .....	 85
1. - Estudios sobre estabilidad respiratoria y resistencia a la supresividad de estirpes haploides de <u>Saccharomyces cerevisiae</u> .....	87
1.1. - Experiencias previas .....	87
1.2. - Estabilidad respiratoria de las estirpes de <u>S. cerevisiae</u> originales .....	87
1.3. - Estabilidad de clones seleccionados al azar, a partir de las estirpes SER19 y Sb-2 .....	89

	<u>Pag.</u>
1.4. - Estabilidad respiratoria y resistencia a la supresividad .....	97
1.4.1. - Supresividad de diversas estirpes rho <sup>-</sup> frente a las estirpes rho <sup>+</sup> originales .....	98
1.4.2. - Resistencia a la supresividad de la estirpe AXp-10 de clones rho <sup>+</sup> derivados de las estirpes Sb-2 y -SER 19 .....	105
1.4.3. - Resistencia a la supresividad de la estirpe Xp-4 de diversas rho <sup>+</sup> empleadas en este trabajo .....	106
2.-Estabilización genética de estirpes rho <sup>+</sup> inestables y repercusión de la misma sobre su resistencia a la supresividad .....	108
3. - Naturaleza de los determinantes genéticos que condicionan la estabilidad respiratoria y la resistencia a la supresividad .....	114
4. - Influencia del genomio mitocondrial de los mutantes rho <sup>-</sup> sobre la estabilidad respiratoria de la progenie haploide de cigotos obtenidos en cruces con rho <sup>+</sup> inestables .....	132
5. - Influencia de las condiciones ambientales sobre la estabilidad y resistencia a la supresividad de estirpes rho <sup>+</sup> .....	140

5. 1. - Variación del porcentaje de células  $\rho^-$  en cultivos de estirpes  $\rho^+$  y de su resistencia a la supresividad, según la etapa de su ciclo de crecimiento ..... 141

5. 2. - Variación del porcentaje de células  $\rho^-$  en cultivos de estirpes  $\rho^+$  y de su resistencia a la supresividad según la modalidad de cultivo ..... 144

5. 3. - Variación del porcentaje de células  $\rho^-$  en cultivos de estirpes  $\rho^+$  y de su resistencia a la supresividad en función del pH inicial del medio de cultivo ..... 145

5. 4. - Variación del porcentaje de células  $\rho^-$  en cultivos de estirpes  $\rho^+$  y de su resistencia a la supresividad en función de la naturaleza de la fuente de carbono presente en el medio ..... 145

6. - Estudio comparativo de la habilidad de cruce de estirpes  $\rho^+$  y  $\rho^-$  ..... 149

DISCUSION ..... 157

- "Supresividad" y "resistencia a la supresividad" ..... 160

- Resistencia a la supresividad y estabilidad respiratoria ..... 164

- Determinantes genéticos que condicionan la estabilidad ..... 170

	<u>Pag.</u>
- Transmisión de la estabilidad respi- ratoria por células rho <sup>-</sup> .....	175
- Influencia de los agentes exteriores sobre la estabilidad respiratoria y resistencia a la supresividad .....	176
- Consideraciones sobre el cálculo de la supresividad .....	178
 CONCLUSIONES .....	 185
 BIBLIOGRAFIA .....	 189



## INTRODUCCION



Por supresividad de estirpes  $\rho^-$  de Saccharomyces cerevisiae se entiende la propiedad que presentan algunas de las mismas, cuando se cruzan con estirpes  $\rho^+$ , para excluir o suprimir el factor rho normal aportado a los cigotos por estas últimas. Las estirpes  $\rho^-$  que presentan esta propiedad reciben el nombre de "supresivas", frente al de "neutros" con el que se conocen las que no la poseen.

Como se desprende de la extensa bibliografía que se cita en el capítulo siguiente, la supresividad ha sido ampliamente estudiada, tanto por lo que respecta a la naturaleza de las estirpes supresivas como al mecanismo por el que se lleva a cabo. Hasta el momento, se ha considerado que el grado de supresividad que presentan las distintas estirpes supresivas es una característica celular de cada una de ellas que presentarían una notable estabilidad en relación con esta propiedad.

En nuestro laboratorio el fenómeno de la supresividad en sus distintos aspectos viene estudiándose desde 1970 y los resultados previos a la iniciación de esta Tesis, a más de aclarar

el papel biológico de la supresividad en relación con la conservación de la especie, parecían indicar, en contra de lo anteriormente expuesto, que la supresividad y el grado de supresividad de una estirpe  $\rho^-$  no es una característica celular constante sino que dependía del tipo de estirpe  $\rho^+$  frente a la que se determinaba, e incluso de la modalidad de cultivo de las mismas.

En principio, el presente trabajo se ha centrado en la comprobación de este último punto y de los factores de tipo genético o ambiental relacionados con las estirpes  $\rho^+$  que afectan la supresividad de las  $\rho^-$ , o, lo que es más correcto, que afectan el grado de resistencia de las estirpes  $\rho^+$  a la manifestación del carácter supresivo de las mutantes  $\rho^-$ .

Se ha podido comprobar plenamente que el grado de supresividad de las estirpes  $\rho^-$  no es constante sino que depende en cada caso de la resistencia a la supresividad de las distintas estirpes  $\rho^+$  con las que se cruzan; resistencia a la supresividad que va ligada a su estabilidad respiratoria, es decir a la tasa de mutación espontánea a  $\rho^-$ .

Al profundizar en la investigación se ha podido comprobar que la estabilidad respiratoria de las estirpes  $\rho^+$  y por ende su resistencia a la supresividad depende de la estabilidad de los genomios mitocondriales de cada una de sus células y que la misma está condicionada por un alelo de los propios genomios mito-

condriales.

También se ha abordado el estudio de la influencia que las condiciones ambientales, -modalidad de cultivo, pH, fase de crecimiento y fuente de carbono- ejercen sobre la resistencia a la supresividad de las estirpes  $\rho^+$ , con resultado negativo.

Finalmente otro problema abordado en este trabajo ha sido el de revisar la fórmula clásica empleada en el cálculo de la supresividad al objeto de evitar los errores que introduce en dicho cálculo, el hecho comprobado también en este trabajo de que el rendimiento en zigotos de cruces  $\rho^+$  por  $\rho^-$  es inferior al de los cruces de células de la estirpe  $\rho^-$  y los mutantes  $\rho^-$  que siempre existen en los cultivos  $\rho^+$ .



PARTE TEORICA

### Mutantes de levaduras con deficiencia respiratoria

En cultivos de muchas especies de Saccharomyces aparecen, de forma espontánea y con una frecuencia en ocasiones grande, mutantes que han perdido de forma permanente la capacidad de obtener la energía necesaria para su vida por vía respiratoria, obteniéndola solamente de procesos fermentativos.

La mayoría de los trabajos realizados con estos mutantes, lo han sido con S. cerevisiae, pero este fenómeno se presenta en una gran variedad de especies, tales como: S. italicus, S. bayanus, S. logos, S. uvarum, S. pastorianus, S. exiguus, S. williams, S. carlbergensis, S. chevalieri... ., a más de en otros géneros de levaduras como Schizosaccharomyces, Bretanomyces, Torulopsis y Cándida. Todas ellas se caracterizan por estar capacitadas para utilizar vías alternativas



en su metabolismo energético, y según Bulder (1964 a, b) son levaduras "petites positivas", es decir, levaduras en las que es posible demostrar la existencia de mutantes deficientes respiratorios, a diferencia de aquellas "petites negativas" en las que no se pueden poner de manifiesto.

La mutación confiere a la célula unas características fenotípicas particulares que se transmiten por herencia, tanto a través de ciclo sexual como en procesos de reproducción vegetativa.

#### Caracteres de los mutantes petites

Los mutantes deficientes respiratorios se diferencian claramente de las células normales, en razón de una serie de características que les confiere la mutación.

Lo primero que llama la atención es el tamaño de las colonias a que dan lugar cuando se cultivan en medios con azúcares en baja concentración como fuente de carbono. Al ser menos eficientes que las células silvestres en la utilización de dichos azúcares, originan colonias más pequeñas que las normales, razón por la cual, un grupo de investigadores franceses (Ephrussi et al, 1949 a; Slonimski and Ephrussi, 1949; Slonimski, 1949; Ephrussi et al, 1949; Tavlitzki, 1949) los llamaron mutantes "petites",

denominación que ha prevalecido sobre las propuestas por otros autores, tales como: mutantes "aer" (Lindgren, 1956; Ogur y St John, 1956); "Secondary colony variant" (Wild and Hinshelwood, 1956); "mutantes R" (Wright y Lederberg, 1957); "mutantes M<sub>k</sub>" (Schwartz, 1959); "variantes W" (Yanagishima, 1956) o "mutantes RD" abreviatura de respiration-deficient, tal como propusieron Moat et al (1959).

Estos mutantes son incapaces de utilizar el oxígeno como aceptor final de electrones, como consecuencia de alteraciones más o menos profundas en la cadena transportadora de electrones, ocasionadas por la pérdida de los citocromos b y a+a<sub>3</sub> o bien por la ausencia solamente de los citocromos c<sub>1</sub> y b<sub>2</sub> (Sherman y Slonimski, 1964; Sherman, 1963). Como consecuencia de lo expuesto, son incapaces de utilizar sustratos degradables solo por vía oxidativa, tales como lactato, glicerol, succinato, acetato, etc. . . . (Ogur y St. John, 1956; Ogur et al, 1954; Yanagishima, 1956).

Otra característica bioquímica que se utiliza para la selección de dichos mutantes, es la incapacidad de utilizar compuestos como el cloruro de 2, 3, 5 trifenil tetrazolium como aceptor de electrones, compuestos que las células normales reducen a formazano, que es rojo insoluble y que se acumula en su interior tiñendo las colonias de rojo (Nagai, 1955; Ogur et al, 1957; Yanagishima, 1956).

Poseen además otras alteraciones enzimáticas, tales

como su bajo contenido en catalasa (Callao y Montoya, 1950) y diferencias en los niveles de deshidrogenasas (Nuñez de Castro, 1972 Arias de Saavedra, 1974).

### Tipos de mutantes petites

Características propias de estos mutantes, tales como su alta frecuencia de aparición a partir de células normales (1 % de mutantes en cultivos de células diploides y 1-5% en los de haploides) especialmente patente en las llamadas estirpes inestables, (Nagai et al, 1961) que llegan a tener hasta el 50% de mutantes en cultivos estacionarios, así como la ausencia total de reversión a lo largo de grandes periodos de tiempo, hizo pensar en la naturaleza citoplasmática de la mutación petite; suposición demostrada plenamente al comprobarse que la segregación de ascosporas procedente de un cigoto obtenido por cruce entre una levadura normal y una petite, era del tipo 4:0 y no 2:2 como hubiese ocurrido si la mutación petite estuviese localizada en genes nucleares, salvo que se debiera a la presencia simultánea de más de una docena de recesivos, cosa bastante improbable dada la alta frecuencia de mutación que presentan (Ephrussi et al, 1949 a y b). La existencia pues de un fac

tor citoplasmático, factor rho , que condiciona la herencia de la capacidad respiratoria, es universalmente aceptada, ya que ha sido satisfactoriamente comprobado por Ephrussi (1953), Wright y Lederberg (1957). Estos mutantes, además, aparecen en el transcurso de la reproducción vegetativa, por lo que fueron llamados mutantes "petites vegetativos".

Sin embargo existen otros mutantes, fenotípicamente idénticos a los anteriores, descritos por Chen et al (1950), cuya mutación está localizada en el núcleo, como se desprende de la segregación de los cigotos, los cuales dan un 50% de ascosporas normales y un 50% de "petite", que han sido denominados mutantes "petites segregacionales" (Sherman, 1963; Sherman y Slonimski, 1964; Rielly y Sherman, 1965). La mutación afecta a genes nucleares, los llamados alelos "pet", "pets" y "petx", localizados en el mapa genético en los siguientes cromosomas, (Wickner, 1976): pet 9 y pet 11 en el cromosoma II ; pets y pet 8 en el cromosoma III; pet 14 en el cromosoma IV; pet 1 y pet 3 en el cromosoma VIII; pet 8 y petx en el cromosoma XIV; pet 17 en el cromosoma XV; pet 2 en el cromosoma XVII.

Se han descrito otros mutantes pet 4, pet 5, pet 6, y pet 7 cuya localización en el mapa genético es dudosa, (Leibowitz, M, 1976).

A efectos de no complicar excesivamente la nomenclatura, vamos a designar estos mutantes nucleares, de acuerdo con

los símbolos propuestos por Sherman y Ephrussi en 1962: P y p que indican, respectivamente, la existencia de los alelos nucleares silvestres normales o la de uno o varios alelos nucleares mutados.

En cuanto a los mutantes citoplasmáticos que tienen alteraciones en el factor rho o factor citoplasmático necesario para la síntesis de enzimas respiratorios se designarán como rho<sup>-</sup> los que conservan el citado factor alterado y como rho<sup>o</sup> los que han perdido dicho factor, reservándose la designación de rho<sup>+</sup> para aquellas células que conservan el factor rho inalterado.

Aunque en la realización de esta Memoria solo se han utilizado mutantes vegetativos, existen pues tres tipos de mutantes:

- mutantes vegetativos : P rho<sup>-</sup> ó P rho<sup>o</sup>
- mutantes segregacionales: p rho<sup>+</sup>
- dobles mutantes: p rho<sup>-</sup> ó p rho<sup>o</sup>

cuyas características han sido descritas por Sherman (1963) , - Sherman y Slonimski (1964).

#### Aislamiento y caracterización de los mutantes rho<sup>-</sup>

Para el aislamiento y caracterización de los mutan-

tes "petites" se emplean una serie de métodos que aprovechan una o varias de las características morfológicas y bioquímicas que presentan dichas mutantes "petites".

Entre los principales encontramos:

- 1) Réplica en placa en medios en los que la glucosa de la placa matriz es sustituida por acetato, lactato, glicerol o succinato. En estos medios no crecen los mutantes petites, por lo que sus colonias pueden identificarse fácilmente en la placa matriz. Este método es especialmente útil para identificar un pequeño número de colonias normales en una población donde las DR son mayoritarias (Wright and Lederberg, 1957).
- 2) Diseminación de los cultivos a ensayar en medios con lactato y una baja cantidad de glucosa como fuente de carbono; en estos medios los mutantes "petites" originan colonias muy pequeñas debido a la escasa disponibilidad de la glucosa, fácilmente diferenciables de las colonias de tamaño grande de las levaduras normales. (Ephrussi y Grandchamp, 1965; Slonimski et al, 1968).
- 3) Diseminación en medios con glucosa y acetato sódico, con un indicador que vira al alcalinizarse el medio por utilización del acetato, tras agotarse la glucosa. Como los mutantes petites no utilizan el acetato no hacen virar el indicador (Ogur et al, 1954) a diferencia de las células suficientes respiratorias.
- 4) Métodos basados en el empleo de colorantes tales como rojo de

Magdala, (Nagai, 1963a), que tiñe fuertemente de rojo a las colonias "petites" o la leucobase de azul de metileno (Gause et al, 1957) que sólo tiñe de azul a las colonias procedentes de células competentes respiratorias, o bien en la adición a cultivos en placa de varios días de compuestos tales como el cloruro de 2-3-5 tri fenil tetrazolium (Ogur et al, 1957) que tiñe de rojo a las colonias originadas por células normales, al reducirse a formazano que se acumula en el interior de las células, mientras que deja blancas aquellas que proceden de mutantes petites y que son incapaces de utilizarlo como aceptor de electrones.

#### Inducción de mutantes rho<sup>-</sup>

Los mutantes rho<sup>-</sup> aparecen espontáneamente en los cultivos de estirpes rho<sup>+</sup> con una frecuencia que caracteriza a la estirpe; utilizando este criterio las estirpes rho<sup>+</sup> de levaduras se clasifican como estables (tasa de mutación menor del 10%) e inestables (tasa de mutación mayor del 10%). No obstante, es ta frecuencia de aparición de mutantes puede ser incrementada artificialmente hasta el 100% por acción de agentes de distinta naturaleza, físicos y químicos, que actúan selectivamente sobre el ADN mitocondrial sin afectar grandemente a los genes nucleares.

Entre los agentes físicos destaca la radiación ultravioleta, el calor e incluso el frío.

La radiación ultravioleta a dosis apropiadas es uno de los agentes más empleados para inducir la aparición de mutantes vegetativos debido a su gran eficacia, (Raut, 1953, 1954) - aunque también aparecen los otros tipos de mutantes pero con menor frecuencia (Sarachek, 1958; Nagai et al, 1961; Lachowicz et al, 1969).

Las temperaturas más altas de las normales producen transiciones y transversiones en el ADN mitocondrial (Ycas et al, 1956; Sherman, 1957, 1958, 1959; Thomas y Williamson, 1971).

Hay estirpes que son sensibles a temperaturas de incubación de 18°C obteniéndose hasta un 100% de mutantes deficientes respiratorios (Weislogel y Butow, 1970; Butow et al, 1971)

Entre los mutágenos de naturaleza química destacan: Los derivados de acridina (Anaranjado de acridina, euflavina, rojo de acridina, etc). Actúan durante la replicación del ADN (Ephrussi et al, 1969), intercalándose entre las bases y produciendo así borraduras y cambios de secuencias, (Lerman, 1961; Nagai, 1963; Avers et al, 1965; Arca et al, 1971; Arakatsu, 1972).

Son muy empleados porque a concentraciones adecuadas no afectan al ADN nuclear, actuando sólo sobre el ADN mitocondrial y obteniéndose por tanto prácticamente solo mutantes  $\rho^-$  típicas carentes de citocromo b y  $a+a_3$  (Ephrussi, 1953;



Slonimski, 1953; Slonimski et al, 1958)

El bromuro de etidio, tiene igual mecanismo de acción que el anteriormente descrito, pero se diferencia en que es activo también sobre células en reposo (Slonimski et al, 1968) (Radloff et al, 1967). Actúa además preferentemente sobre ADN superenrollados, siendo por ello muy eficaz cuando se emplea a bajas concentraciones para inducir mutaciones exclusivamente en el ADN mitocondrial (Waring, 1968) Hay que hacer notar que tratamientos prolongados con este agente llevan al parecer a la destrucción total del factor rho (Nagley y Linnane, 1970); (Goldring et al, 1970). Aparte de los expuestos, existe una larga serie de mutágenos, menos empleados por su menor eficacia a la hora de inducir mutaciones  $\rho^-$  y entre los que citaremos Pinacianol (Sugimura et al, 1969); 4 Nitroquinolina 1-óxido (Nagai, 1969); Auxina (Yanagishina, 1964); Dodecil sulfato sodico (Pinto da Costa y Bacila, 1973); Fluor uracilo (Arca et al, 1971); Sales de metales pesados (Nagai et al, 1961), etc.

#### Naturaleza química del factor rho

El factor rho se define como el determinante genético responsable de la competencia respiratoria en levaduras.

Estudios sobre el ADN mitocondrial de los mutantes

$\rho^-$  han puesto de manifiesto que el mismo muestra una serie de alteraciones en sus propiedades físicas cuando es comparado con el existente en las células normales (Mounolou, Jacob, y Slonimski, 1966; Mehrotra y Mahler, 1968; Bernardi et al 1968; Holleberg, Borst y Van Bruggen, 1972); ello llevó en principio a identificar el factor  $\rho$  con el ADN mitocondrial.

El ADN mitocondrial de los mutantes  $\rho^-$  presenta una serie de características entre las que destacan:

- Disminución de su densidad con respecto al normal que puede ponerse de manifiesto mediante centrifugaciones con gradiente de cloruro de cesio (Carnevali, Morpurgo y Tecce, 1968, 1969; Mounolou et al, 1966) e indica un menor grado de su perenrollamiento o ausencia del mismo.
- Menor tamaño molecular que el normal, lo que implica la existencia de grandes borraduras (Michaelis, 1971; Nagley y Linnane, 1970).
- Poseer una gran heterogeneidad intramolecular 96% A=T y 4% G≡C estando estos últimos pares de bases dispuestos en regiones limitadas, que son las responsables de la información genética que posee dicho ADN (Prunell y Bernardi 1974), (Carnevali y Leoni 1972).

Finalmente, la obtención de mutantes  $\rho^-$  por tratamiento con bromuro de etidio y derivados de acridina, que actúan selecti

vamente sobre el ADN mitocondrial a concentraciones adecuadas, y la obtención de mutantes  $\rho^0$  mediante tratamientos prolongados con bromuro de etidio, en los que se demostró la ausencia de ADN mitocondrial (Goldring et al, 1970) (Nagley Linnane, 1970), vinieron a confirmar definitivamente que el factor  $\rho$  es el ADN mitocondrial y que aquellas células que lo poseen inalterado tienen una suficiencia respiratoria máxima (células  $\rho^+$ ); la alteración del ADN mitocondrial tiene como consecuencia la aparición de los llamados mutantes  $\rho^-$  y la pérdida del mismo origina mutantes  $\rho^0$ .

#### Bases moleculares de la mutación $\rho^-$

Para explicar la formación de mutantes  $\rho^-$  y su frecuencia de aparición se han propuesto unas hipótesis mas o menos satisfactorias que a continuación se exponen:

- Clark-Walker et al (1974) proponen la siguiente hipótesis con dos alternativas para la formación de mutantes  $\rho^-$ :

En una primera etapa se originarían moléculas de ADN circulares, mas pequeñas que el genomio completo mitocondrial, mediante excisiones de bucles y borraduras a lo que seguiría reordenaciones estructurales dentro y entre las moléculas de ADN

circulares, que reducirían enormemente las porciones transcribibles del citado ADN.

La aparición de células  $\rho^-$  a partir de estos progenitores podría seguir 2 caminos:

a) un proceso pasivo que dependería de la segregación de células con sólo ese tipo de moléculas circulares, las cuales no tendrían todas juntas la información genética equivalente a la de un genoma mitocondrial completo.

b) un proceso activo, que a su vez podría ser debido bien a una mayor velocidad de replicación de las unidades circulares más pequeñas, o bien moléculas defectivas por integración de las mismas en los genomas mitocondriales completos, lo que daría lugar a híbridos, menos estables que los monómeros, y que darían fácilmente origen a genomas defectivos, mediante la formación y excisión de bucles.

Según los autores citados este proceso, sería el responsable de la aparición de los mutantes  $\rho^-$ , pero la frecuencia con que aparecen dependería de factores intrínsecos propios de cada célula, tales como la estructura del ADN mitocondrial, número de moléculas de ADN mitocondrial por célula, etc.

De otra parte y basándose en la menor densidad que presenta el ADN mitocondrial de las células  $\rho^-$ , Carnevali et al (1968), propusieron la siguiente hipótesis para explicar el meca

nismo de formación de los mutantes  $\rho^-$ :

De una parte la ADN polimerasa normalmente tiene la posibilidad de separarse de la cadena de ADN que esta copiando y, de otra, la replicación del ADN siempre comienza en el mismo punto; la separación, por tanto, del enzima antes del final de la duplicación del ADN, conduciría a la formación de fragmentos de menor tamaño que el genomio original y todos ellos tendrían en común el segmento inicial correspondiente al punto de iniciación. Estos fragmentos no poseerían la información genética completa del genomio mitocondrial siendo incapaces de cumplir su función y determinando así el carácter  $\rho^-$  de las células.

Esto explicaría el hecho de que la mutación siempre conduce a una disminución en la densidad del ADN<sub>m</sub> y a un enriquecimiento de pares A=T, debido a que la parte inicial de la molécula es particularmente rica en A y en T y que la ADN polimerasa, una vez separado del molde, continuaría su función, sintetizando poli dAT, (Schachman et al 1960; Okazaki y Kornberg, 1964).

Finalmente Prunell y Bernardi (1974) de acuerdo con el modelo básico que proponen para el genomio mitocondrial a base de fragmentos diseminados de espaciadores (ricos en pares A=T que no se transcriben) y genes (secuencias en las que predominan los pares G=C), explican la alta frecuencia de mutación espontánea a  $\rho^-$  por originarse entre cruzamientos in-

ternos que excinden bucles, lo que da lugar a grandes borraduras y liga secuencias de nucleótidos pertenecientes a los espaciadores, originándose así moléculas de ADN que, a más de un menor tamaño molecular, mostrarían una gran heterogeneidad intramolecular con una proporción A=T de 96 moles por ciento, frente a 4 por ciento de G ≡ C, porcentaje este último que no es taría distribuido homogéneamente a lo largo de toda la molécula sino localizado en regiones delimitadas de la misma, lo que haría posible que el genomio mitocondrial rho<sup>-</sup> pueda llevar aún cierta información genética (Carnevali y Leoni, 1972).

### Supresividad

Las mutaciones citoplasmáticas con deficiencias respiratorias ó mutantes rho<sup>-</sup> de S. cerevisiae pueden, de acuerdo con su comportamiento en cruces con levaduras normales, ser clasificadas en dos categorías: rho<sup>-</sup> neutras y rho<sup>-</sup> supresivas, éstas últimas imponen su caracter rho<sup>-</sup> a los cigotos con una frecuencia que define su grado de supresividad. Por tanto el ca racter rho<sup>-</sup> no siempre es recesivo, a veces excluye o suprime el caracter rho<sup>+</sup> tanto en los cigotos como en la progenie haploide ( Ephrussi et al, 1954, 1955).

La capacidad supresiva de estos mutantes está condicionada por la alteración del factor normal citoplasmático (factor  $\rho$ ), es decir, es una propiedad de los mutantes  $\rho^-$  (Sherman y Ephrussi, 1962), los cuales poseen un grado de supresividad que exhibe considerable estabilidad durante la reproducción vegetativa, es pues el porcentaje de supresividad una herencia característica de cada estirpe, de donde se deduce que existe una estrecha correlación madre-hija (Ephrussi y Grandchamps, 1965), lo que no impide que puedan sufrir dichos mutantes  $\rho^-$  mutaciones citoplasmáticas que modifiquen su grado de supresividad (Ephrussi y Grandchamp, 1965; Rank y Person, 1969).

Así pues, el porcentaje de cigotos que originan colonias  $\rho^-$  varía con la especificidad de la estirpe  $\rho^-$  empleada, y va desde el 0% ( $\rho^-$  neutras) hasta valores tan altos como del 99% ( $\rho^-$  altamente supresivas). Las mutantes neutras son aquellas que no imponen su fenotipo en el cigoto y se han querido identificar con mutantes que carecen de ADN mitocondrial ( $\rho^0$ ). A favor de ello están los resultados obtenidos por Goldring et al (1970, b) y Michaelis (1971) que muestran cómo tratamientos prolongados con bromuro de etidio inducen la producción de mutantes petite carentes de ADNm y de comportamiento neutro, pero, de otra parte, Yotsuyanagi (1962) aunque comprobó estos resultados, encontró además que existen otras estirpes igualmente neutras cuyo ADN mitocondrial sólo está alterado (Mounolou et al, 1966; Bernardi et al, 1968;



Mehrotra y Mahler, 1968; Carnevali et al, 1969; Nagley y Linnane, 1970).

Entre los valores extremos de supresividad encontrados, 0% al 99%, hay grados de supresividad intermedios característicos de muchas estirpes  $\rho^-$ , y que no son debidos a la existencia de poblaciones mixtas de células neutras y supresivas sino a estados intermedios de supresividad existentes a nivel celular -- (Ephrussi y Grandchamp, 1962).

De lo expuesto hasta el momento se deduce claramente que los mutantes  $\rho^-$  aparecen como consecuencia de alteraciones de su ADN mitocondrial y poseen un grado de supresividad característico. Establecidas estas dos premisas, se intentó buscar la relación existente entre ellas, (Michaelis et al, 1971):

- relación entre la densidad del ADN mitocondrial de los mutantes  $\rho^-$  y su grado de supresividad. Efectivamente los mutantes  $\rho^-$  poseen un ADN m cuya densidad es menor que el de las estirpes silvestres (Mounolou et al, 1966), (Carnevali et al, 1968, 69) pero no existe correlación entre este carácter y la supresividad, ya que hay que tener en cuenta que el ADN mitocondrial posee regiones de distinto contenido en G=C (Bernardi 1970), y una borradura, según las regiones en que se origine, puede alterar el gradiente de densidad grandemente o nada, independientemente de que la supresividad del mutante resultante sea mayor o menor.

- relación entre peso molecular del ADN mitocondrial de los mutan



tes  $\rho^-$  y su grado de supresividad. El peso molecular del ADN mitocondrial es menor en los mutantes petites que en las de tipo silvestre, pero tampoco existe en este caso una correlación con el grado de supresividad.

- relación entre los mutantes obtenidos con bromuro de etidio y su grado de supresividad. Estudios comparativos de la cinética del bromuro de etidio como inductor de mutantes  $\rho^-$  y el grado de supresividad de las mismas demuestran que el tamaño del ADN mitocondrial se reduce al incrementar el tiempo de exposición al mutágeno (Goldring et al, 1970) pero que ello no guarda una relación clara con el grado de supresividad. Si la exposición al bromuro de etidio es corta, la mayoría de las células que se obtienen son mutantes  $\rho^-$  con alto poder supresivo; con un tiempo de exposición intermedio la mayoría de las células  $\rho^-$  son supresivas, pero ya se obtienen algunas de bajo grado de supresividad; y finalmente, con tiempos de exposición mas largos se logra un predominio de mutantes neutras, presumiblemente  $\rho^0$ .

#### Bases moleculares de la supresividad

Se han propuesto numerosas hipótesis para intentar dilucidar el mecanismo íntimo de la supresividad que como ha quedado dicho es la propiedad que presentan algunas mutantes  $\rho^-$

para excluir o suprimir el factor rho normal del cigoto, aportado por las estirpes rho<sup>+</sup> con las que se realiza el cruce.

Ephrussi y Grandchamp (1965) definen la existencia de un factor normal ( F N ) necesario para la síntesis de enzimas respiratorias, propio de las estirpes rho<sup>+</sup> y de un factor supresivo ( F S ) aportado por las estirpes rho<sup>-</sup> al cigoto, en donde se establecerán relaciones de represión mutua entre el F N y el F S. La supresividad sería el resultado de la pérdida del factor F N. La acción del F S no sería inmediata, no afectaría la síntesis de los enzimas respiratorios ni conduciría a la parada inmediata de su síntesis, sólo interferiría con la normal replicación del F N.

Existiría, pues, algún tipo de interferencia entre los ADN mitocondriales normal y mutado cuando ambos están presentes en el cigoto. Ahora bien: ¿qué tipo de interferencia ocurre? ¿Bajo qué controles están? ¿Cómo se afecta el ADN mitocondrial normal?.

Rank y Person (1969), dado que las moléculas de ADN mitocondrial mutado son más pequeñas que las de tipo silvestre, proponen un modelo basado en la existencia de una mayor velocidad de replicación del primero, lo que traería como consecuencia la eliminación por dilución del ADN mitocondrial normal. Esta hipótesis está de acuerdo con los resultados obtenidos por Carnevali et al (1969), Slonimski (1968), Borst y Kroon (1969) y Nagley y Linnane (1972) que indican que en las células haploides normales hay

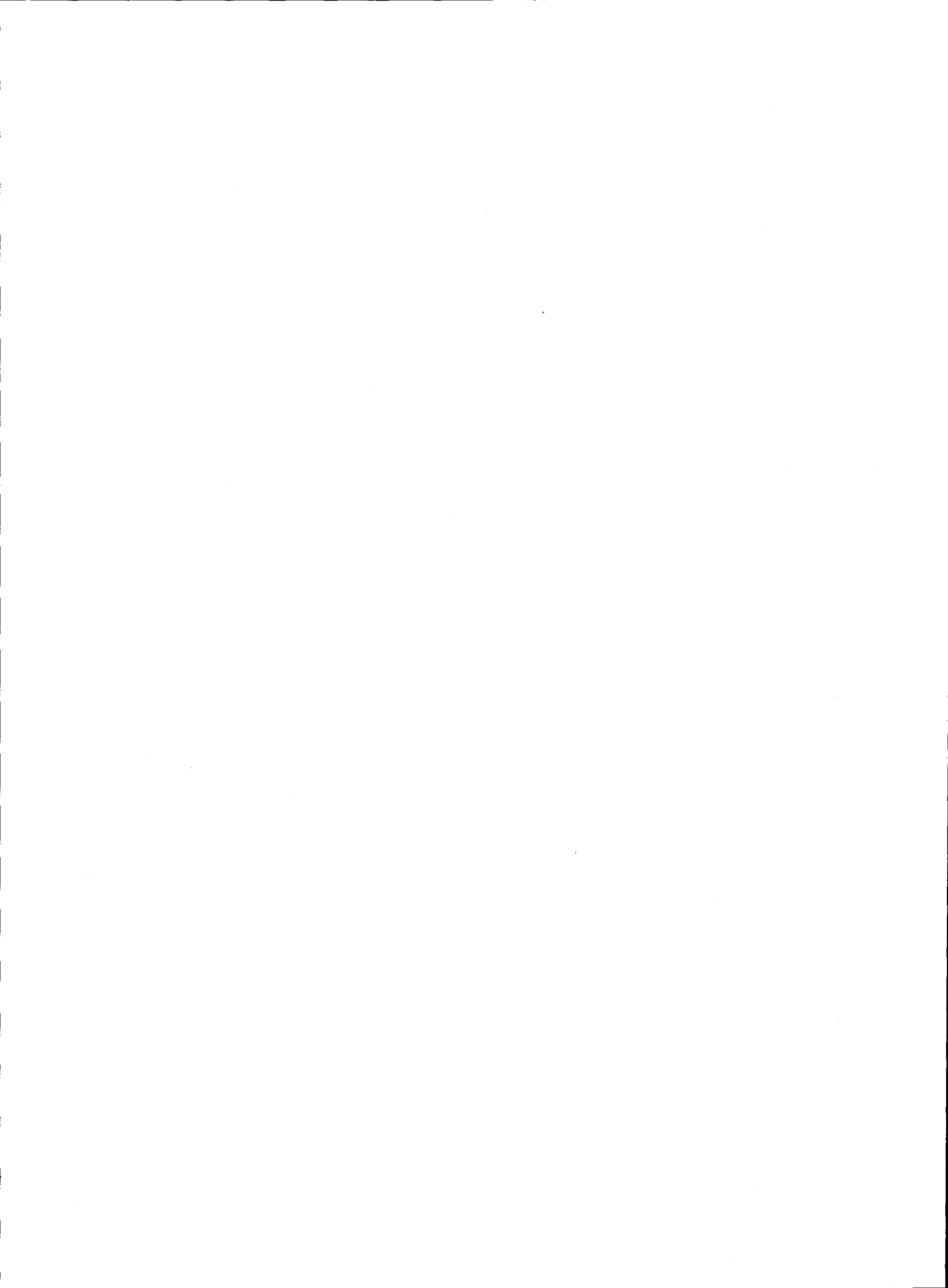
unas cincuenta unidades de ADN mitocondrial, frente a las quinientas unidades existentes en los mutantes  $\rho^-$ , que además son de menor tamaño y, por tanto, requerirían menor tiempo para su replicación lo que, como queda dicho, favorecería la pérdida del ADN mitocondrial normal en el cigoto por simple dilución, desapareciendo así el fenotipo normal.

Sin embargo, Bech-Hansen y Rank (1972) observaron que una estirpe  $\rho^-$  se comportaba como supresiva frente a una  $\rho^+$  y como neutra frente a otra estirpe  $\rho^+$  diferente. Para explicar este hecho propusieron la hipótesis de que la supresividad o neutralidad de una estirpe  $\rho^-$ , viene condicionada por la existencia o no, respectivamente, de un factor "q" en la estirpe  $\rho^+$  con la que se cruza, es decir que una estirpe  $\rho^-$  se comporta como neutra, cuando se cruza con estirpes  $\rho^+$  que no contiene el factor "q" y se comporta como supresiva cuando en ellas está presente dicho factor "q". Los análisis genéticos indican que el factor "q" está condicionado por una mutación recesiva en un gen nuclear "Q", que es el responsable del mantenimiento de un ADN mitocondrial competente. El factor "q" interaccionaría en el cigoto con el factor supresivo originando un ADN mitocondrial anormal que tendría como consecuencia la aparición del fenotipo  $\rho^-$ .

Waxman (1974) también apoya la existencia de un control nuclear sobre la expresión o no de la capacidad supresiva de una estirpe  $\rho^-$ .

De otra parte los resultados obtenidos por Michaelis et al (1971) al estudiar la cinética del bromuro de etidio sobre la producción de mutantes *petites* están de acuerdo con la hipótesis de Coen et al (1970), el cual propone un modelo para explicar la supresividad en base a una más alta frecuencia de recombinación entre el ADN mitocondrial mutado y normal. Así en el cigoto formado entre una célula  $\rho^+$  y una  $\rho^-$  muy supresiva, el ADN mitocondrial alterado, frecuentemente puede introducir un error en el ADN mitocondrial normal por recombinación, destruyendo pues la función del ADN del tipo salvaje. Obviamente cuando el cruce se realiza con una neutra que carece de ADN mitocondrial, el cigoto no pierde el carácter normal del ADN mitocondrial silvestre. Sin embargo, este modelo no se considera probable ya que implica que la recombinación tenga lugar en todas las unidades mitocondriales y simultáneamente.

MATERIAL Y METODOS



## 1. MICROORGANISMOS

Todos los ensayos y experiencias de esta memoria se han realizado con estirpes de Saccharomyces cerevisiae cuya procedencia y características se exponen a continuación.

### 1.1. Estirpes haploides de partida de S. cerevisiae

Todas las estirpes obtenidas a lo largo de este trabajo proceden de estirpes haploides de S. cerevisiae amablemente enviadas por el Dr. Jean F. Warfel, de la Universidad de California, Berkeley, procedentes de la colección del Prof. Mortimer, del citado centro cuya nomenclatura y características genéticas son:

X979 - 2A :  $\underline{\alpha}$ ,  $\underline{tri}_1$ ,  $\underline{his}_3$ ,  $\rho^+$

S856 - c :  $\underline{a}$ ,  $\underline{ade}_1$ ,  $\underline{lis}_2$ ,  $\rho^+$

#### 1.1.1. Estirpes derivadas de las anteriormente citadas en el apartado (1.1) empleadas en la realización del trabajo.

X-3: estirpe  $\underline{\alpha}$ ,  $\underline{tri}_1$ ,  $\underline{his}_3$   $\rho^+$  seleccionada a partir de un

cultivo de la X979 - 2A, en razón de su estabilidad para el marcador his<sub>3</sub>.

Sb-2 : estirpe a, ade<sub>1</sub>, lis<sub>2</sub> rho<sup>+</sup> seleccionada a partir de la S856-c.

SER19 : estirpe a, ade<sub>1</sub>, lis<sub>2</sub> rho<sup>+</sup> seleccionada a partir de la Sb-2 y resistente a la eritromicina ( 5 mg / ml ).

1. 1. 2. Estirpes haploides rho<sup>+</sup> presentes en cultivos de las estirpes citadas en el apartado (1. 1. 1).

Xg-5: estirpe rho<sup>+</sup> seleccionada en cultivos de la X-3.

Sg-5: estirpe rho<sup>+</sup> seleccionada en cultivos de la estirpe Sb-2.

SERg 1 ... SERg 25: clonos seleccionados al azar entre colonias de la estirpe SER19 crecidas sobre medio NGL.

Sbg-1 ... Sbg-25: clonos seleccionados al azar entre colonias de la estirpe Sb-2 crecidas sobre medio NGL.

1. 1. 2. 1. Estirpes haploides rho<sup>+</sup> presentes en cultivos de las estirpes citadas en el apartado (1. 1. 2)

SERg 3-1... SERg 3-20 : clonos obtenidos de una posterior subclonación del clono SERg 3.



SERg 13-1 ... SERg 13-20 : clones obtenidos de la posterior subclonación del clono SERg 13.

Sbg 9-1 ... Sbg 9-20 : clones obtenidos de la posterior subclonación de la estirpe Sbg 9.

Sbg 22-1 ... Sbg 22-20 : clones obtenidos por una subclonación posterior del clono Sbg 22.

### 1. 1. 3. Estirpes rho<sup>-</sup> haploides empleadas

#### 1. 1. 3. 1. Obtenidas a partir de mutantes espontáneas

Xp-1 ... Xp-11 : a, his<sub>3</sub>, tri<sub>1</sub>, rho<sup>-</sup> procedentes de cultivos en fase estacionaria de la estirpe X-3.

Sp-1 ... Sp-18 : a, ade<sub>1</sub>, lis<sub>2</sub>, rho<sup>-</sup> procedentes de cultivos en fase estacionaria de la estirpe Sb-2.

SERp 1 : a, ade<sub>1</sub>, lis<sub>2</sub>, rho<sup>-</sup> procedente de cultivos en fase estacionaria de la estirpe SER 19.

SXp 4-14 : a, ade<sub>1</sub>, lis<sub>2</sub>, rho<sup>-</sup> procedente de cultivos en fase estacionaria de la estirpe SXg 4-14.

SXp 4-19 : a, ace<sub>1</sub>, lis<sub>2</sub>, rho<sup>-</sup> procedente de cultivos en fase estacionaria de la estirpe SXg 4-19.

SbXp 1-69 , SbXmp 1-69 : a, tri<sub>1</sub>, his<sub>3</sub>, rho<sup>-</sup> procedentes de cultivos en fase estacionaria de la estirpe SbXg 1-69.

1. 1. 3. 2. Obtenidas mediante tratamientos con anaranjado de acridina

AXp-1 ... AXp-10 :  $\alpha$ , his<sub>3</sub>, tri<sub>1</sub>, rho<sup>-</sup> obtenidas por tratamientos con el citado mutágeno de cultivos de la estirpe X-3.

1. 2. Estirpes rho<sup>+</sup> haploides procedentes de cruces entre estirpes rho<sup>+</sup> y rho<sup>-</sup>

1. 2. 1. Progenie haploide rho<sup>+</sup> procedente de seis cigotos obtenidos en cruces entre SER 19 y AXp-10

SXg 1-1 ... SXg 1-98 : progenie rho<sup>+</sup> haploide procedente del cigoto nº 1.

SXg 2-1 ... SXg 2-48 : progenie rho<sup>+</sup> haploide, procedente del cigoto nº 2.

SXg 3-1 ... SXg 3-44 : progenie rho<sup>+</sup> haploide procedente del cigoto nº 3.

SXg 4-14, SXg 4-19, SXg 4-27, SXg 4-28, SXg 4-31, SXg 4-125, SXg 5-11, SXg 6-9, SXg 6-48, SXg 6-50 : progenie rho<sup>+</sup> haploide, de idéntico genotipo a la estirpe madre SER 19, obtenida de los cigotos números 4, 5 y 6 respectivamente, tras su esporulación y posterior germinación.

1.2.2. Progenie haploide  $\rho^+$  procedente de un cruce entre SXg 1-31 y AXp-10.

S2Xg 1-1 ... S2Xg 1-99 : progenie  $\rho^+$  haploide obtenida tras la esporulación y posterior germinación de un cigoto procedente de dicho cruce.

1.2.3. Progenie haploide  $\rho^+$  procedente de un cruce entre SXg 4-31 y AXp-10

S2Xg-10 ... S2Xg-65 : progenie  $\rho^+$  haploide obtenida tras la esporulación y posterior germinación de un cigoto procedente de dicho cruce.

## 2. MEDIOS DE CULTIVO

Todos los medios que a continuación se detallan fueron preparados y esterilizados de acuerdo con las técnicas usuales empleadas en Microbiología.

### 2. 1. Medios de conservación y crecimiento

Medio NG : empleado para cultivo y conservación de levaduras, corresponde al descrito por Lindegren et al (1958) y presenta la siguiente composición:

Sulfato magnésico .....	1 g
Fosfato monopotásico .....	2 g
Sulfato amónico .....	3 g
Peptona .....	3.6 g
Extracto de levadura .....	4 g
Glucosa .....	10 g
Agua .....	1000 ml
pH final	4.5

Para utilizarlo en forma sólida se añadieron 20 g de agar/litro.

Medio NL : igual al anterior, pero con lactato sódico a concentración de 20 g/litro como única fuente de carbono.

Ha sido utilizado para seleccionar estirpes  $\rho^+$  ó  $\rho^-$  para comprobar la naturaleza  $\rho^+$  o  $\rho^-$  de los diferentes mutantes ensayados, ya que las estirpes con deficiencia respiratorio no son capaces de utilizar el lactato como fuente de carbono.

Medio NGL : derivado igualmente del NG pero con glucosa en concentración de 1g/litro y lactato sódico 20 g/litro. Ha sido empleado para la diferenciación de células  $\rho^+$  y  $\rho^-$  y para el recuento de mezclas de ambas, de acuerdo con la técnica descrita por Slonimski et al (1968). En este medio las estirpes con deficiencias respiratorias al utilizar exclusivamente como fuente de carbono la pequeña cantidad de glucosa de que disponen, dan lugar a colonias de muy pequeño tamaño, fácilmente diferenciables de las normales.

## 2.2. Medios empleados para la esporulación de levaduras

Comprenden los llamados medios de "pre-esporulación" empleados para la obtención de una masa abundante de células en óptimas condiciones fisiológicas, y los medios de "esporulación" que por el contrario son medios pobres y con fuentes de carbono difícilmente utilizables.

### 2.2.1. Medio de pre-esporulación

Medio pE : Fowell (1969), modificado con la siguiente composición:

Glucosa .....	1 g
Extracto de levadura .....	2.5 g
Acetato potásico .....	20 g
Agua .....	1000 ml

Este medio demostró ser muy eficaz, ya que, como se ha podido comprobar en este trabajo, mediante su empleo se llegó a conseguir la esporulación del 90% como mínimo, de las células presentes.

### 2.3. Medio de conjugación

Se han experimentado diversos medios para la puesta a punto del proceso de conjugación, habiéndose elegido como más eficaz el llamado medio MC, cuya composición es la siguiente:

Glucosa .....	50 g
Extracto de levadura .....	10 g
Peptona .....	5 g
Agua .....	1000 ml

Este medio es el propuesto por Haefner (1965), con

las modificaciones introducidas por Fowell (1969 c), consisten -  
tes en la adición de una alta concentración de glucosa que favo-  
rece el cruce entre las razas a y α .

#### 2.4. Medio mínimo de Wickerham (1946)

En este medio sólo pueden crecer estirpes prototrofas, por lo que se ha empleado para la selección de cigotos de dicho tipo y para la comprobación del genotipo de las razas auxótrofas empleadas, mediante la adición, en cada caso, de los nutrientes adecuados, de acuerdo con la técnica descrita en el apartado 3.

Se ha utilizado el medio de Wickerham (1946) de la casa Difco (Bacto Yeast Nitrogen Base w/o amino acids dehydra ted). La preparación del medio se hace disolviendo 13.4 g en 100 ml de agua destilada y esterilizando por filtración, con lo que se obtiene una solución 20 veces más concentrada que la que se necesita para el medio mínimo tal como se emplea. Se guarda en nevera. Para medios sólidos se adiciona agar purificado Difco ó BBL a concentración de 20 g/litro. Para preparar el medio definitivo, se suspende el agar purificado en agua destilada, se añade la fuente de carbono correspondiente a la concentración adecuada, y se esteriliza en autoclave. Posteriormente se deja enfriar hasta 60º y se le añade el 5% de la solución de medio m<sub>í</sub>nimo 20 veces concentrada. Tras breves momentos, para que se

difunda a todo el volumen, se reparte en cajas de Petri a razón de 20 ml/placa.

En el caso de medios líquidos se disuelve la fuente de carbono en agua destilada y se esteriliza por filtración o en autoclave. En frío se le añade la cantidad correspondiente de medio mínimo, 20 veces más concentrada.

#### 2.4. 1. Variantes empleadas

Medio MG : en el que la fuente de carbono es glucosa a concentración 10g/litro.

Medio MLG : en el que la fuente de carbono la constituyen glucosa y lactato sódico en concentraciones de 1 g y 20 g por litro, respectivamente.

Medio ML : en el que la fuente de carbono es lactato sódico a una concentración de 20 g/litro.



### 3. TECNICAS PARA LA COMPROBACION DE LOS REQUERIMIENTOS NUTRITIVOS DE ESTIRPES AUXOTROFAS

#### 3.1. Preparación de los medios correspondientes

El medio empleado para ello fué el medio mínimo MG añadido de los marcadores requeridos en cada caso en una concentración final de 20 µg/ml.

De acuerdo con las características de las estirpes empleadas en este trabajo, se emplearon los siguientes medios

MG + adenina

MG + lisina

MG + adenina + lisina

MG + triptófano

MG + histidina

MG + triptófano + histidina

Los aminoácidos y adenina se disolvieron separadamente en agua destilada a una concentración 100 veces mayor que la final y se esterilizaron mediante filtración por Millipore (poros de 0.45 micras de diámetro), añadiéndose al medio MG en las proporciones adecuadas una vez esterilizado éste y enfriado a 60°.

### 3.2. Comprobación de los requerimientos nutritivos

La comprobación de las necesidades nutritivas de las estirpes auxótrofas empleadas, se llevó a cabo diseminando una suspensión de las mismas, de concentración adecuada, en los medios mínimos descritos en el apartado anterior y observando la aparición o no del crecimiento después de la incubación a 28°C durante 72 horas.

#### 4. TECNICAS EMPLEADAS EN LA OBTENCION Y SELECCION DE MUTANTES $\text{rho}^-$

La mayor parte de las estirpes con deficiencias respiratoria  $\text{rho}^-$  empleadas en este trabajo, se obtuvieron a partir de mutantes espontáneas aparecidas en cultivo de las correspondientes estirpes  $\text{rho}^+$ , empleando los métodos de diferenciación y selección que se describen más adelante.

Otros se obtuvieron mediante tratamientos con anaranjado de acridina que induce la aparición de mutantes citoplasmáticas específicas, por el método descrito por Gonzalez (1974).

##### 4.1. Diferenciación y selección de estirpes $\text{rho}^-$

Para la diferenciación de las estirpes DR se han empleado dos técnicas distintas. Una de ellas consiste en utilizar como medio diferencial el NLG, en el cual las células deficientes respiratorias, incapaces de utilizar fuentes no fermentables de carbono, dan lugar a colonias muy pequeñas cuyo crecimiento es debido, exclusivamente a la escasa cantidad de glucosa presente en el medio. Por el contrario, las células normales son capaces de utilizar el lactato originando colonias de un tamaño mucho mayor.

Esta técnica proporciona un método fácil de diferenciación entre estirpes normales y deficientes respiratorias.

El otro método consiste en la utilización de cloruro de 2, 3, 5 trifenil-tetrazolio (CTT), que actúa como aceptor final de electrones de la cadena transportadora de los mismos, pasando por reducción a formazano, que es insoluble y de color rojo.

Utilizado como más abajo se describe, las colonias normales se tiñen de rojo mientras que las DR, cuya cadena transportadora de electrones carece de varios citocromos, permanecen blancas.

#### 4. 1. 1. Diferenciación por siembra en medio NLG

Se diseminó sobre cajas de Petri de medio NLG una suspensión adecuada de las células cuyo carácter normal o deficiente se quería probar, incubando posteriormente a 28°C durante 4 días. Transcurrido este tiempo se distinguían con facilidad dos tamaños de colonias en el caso de haber mezcla de células  $\rho^+$  y  $\rho^-$ , o todas pequeñas en el caso de un cultivo enteramente deficiente.

#### 4. 1. 2. Técnica del cloruro de trifenil tetrazolio

Se basa en la reducción catalizada por los enzimas

de la cadena transportadora de electrones de la célula del 2, 3, 5 trifenil tetrazolio a formazano, compuesto insoluble de color rojo que se deposita sobre las células dándole a las colonias por ellas formadas un tinte rosado.

El trifeniltetrazolio es tóxico para las levaduras por lo que no es posible cultivar en su presencia. Para evitar este inconveniente, se siguió la técnica de Ogur et al (1957); las levaduras se incubaron primero en cajas de Petri con medio NG durante 4 días a 28°. Pasado este tiempo se vertió sobre las cajas se volvieron a incubar a 37° durante 3 horas, pasadas las cuales se identifican fácilmente las colonias de levadura con deficiencia respiratoria que permanecen blancas, de las de levadura normal que aparecen teñidas de rojo.

#### Preparación del reactivo

Cloruro de 2, 3, 5 trifeniltetrazolio	1 g
Agar	15 g
Tampón fosfato 0.066 M pH 7	1000 ml

Se mezcló el agar con la solución de tampón fosfato y se fundió en autoclave a 120°, 10 minutos. Una vez enfriado en baño de agua a 45° se le añadió el cloruro de trifeniltetrazolio y se vertió sobre las cajas de Petri.

#### 4.1.3. Selección de estirpes rho<sup>-</sup>

Se utilizó siempre la técnica en que se emplea el medio diferencial NLG. El método del CTT no se utilizó para el aislamiento de estirpes, ya que como se ha dicho esta substancia ejerce un efecto tóxico a más de que las manipulaciones son engorrosas debido a la capa de agar con que se cubren las colonias.

La selección se llevó a cabo por siembra de las colonias de pequeño tamaño en tubos inclinados de agar-NG, siguiendo los métodos usuales de técnica microbiológica.

#### 4.2. Comprobación de la deficiencia respiratoria y tipo de la misma de estirpes seleccionadas

Aún cuando los métodos de diferenciación empleados son muy eficaces para distinguir las colonias de levadura con deficiencia respiratoria, las estirpes seleccionadas fueron sometidas antes de su empleo a una serie de pruebas; al objeto de confirmar dicha deficiencia respiratoria así como la naturaleza nuclear(estirpes p)ócitoplasmáticas de las mismas (estirpes rho<sup>-</sup>).

La deficiencia respiratoria se confirmó aplicando la técnica del CTT, ya descrita, a las estirpes seleccionadas y observando su comportamiento en medios con lactato como única fuente

de carbono, donde el crecimiento debe ser nulo después de una incubación a 28° durante 4 días, tiempo más que suficiente para que crezca una estirpe normal.

La naturaleza nuclear o citoplasmática de las mutaciones seleccionadas se determinó mediante pruebas de cruce - con una estirpe  $\rho^+$  de signo contrario, seguidas de selección de colonias  $\rho^+$  diploides. Las estirpes obtenidas se hicieron esporular y se procedió a analizar la proporción de ascosporas normales y con deficiencia respiratoria. La obtención de proporciones próximas a 50:50 indican que la estirpe es p mientras que las proporciones de 100 a 0 o cifras próximas indicaron la naturaleza citoplasmática de la mutación.

## 5. TÉCNICAS DE CRUCE ENTRE LEVADURAS HAPLOIDES Y SELECCION DE CIGOTOS PROTOTROFOS.

Como ha quedado indicado las estirpes empleados son heterotálicas, y cada tipo de conjugación opuesto posee marcadores auxotróficos distintos, de manera que los cigotos originados en los cruces son capaces de crecer en medio mínimo, pero no así las células haploides que no llegan a cruzarse.

En todos los casos las técnicas seguidas han sido la citada por Fowell (1962, a) con ligeras modificaciones, y la de mi cromanipulación que más adelante se describe.

### 5.1. Determinación cualitativa de la capacidad de cruce y viabilidad de los cigotos

Se llevó a cabo depositando en la superficie de medio MG sólido una gota de solución salina estéril en la que se mezclan con ayuda del asa de platino las células "a" y "α" a cruzar. Una vez seca la gota de la mezcla, se llevan las placas a la estufa de 28°C y se incuban durante 3-4 días, tiempo suficiente para observar la aparición del crecimiento que indica que ha tenido lugar el cruce y que los cigotos son viables.



## 5.2. Cruce en medio de conjugación líquido

El método descrito sólo es útil para comprobar si una estirpe haploide se cruza con otra y para el aislamiento de cigotos prototrofos. A la hora de obtener grandes cantidades de cigotos ó de realizar el cruce en condiciones " standard ", los cruces se llevaron a cabo en medio líquido mediante la siguiente técnica:

Las estirpes a cruzar se hicieron crecer durante 48 horas en medio NG sólido, obteniéndose a partir de estos cultivos suspensiones de células en solución salina fisiológica de una concentración aproximada de  $10^7$  cel/ml. Las suspensiones se dejaron en reposo durante una noche a la temperatura ambiente, al objeto de que las células en gemación terminen el proceso. Después de este periodo de reposo se mezclaron 1 ml de suspensión de la estirpe "a" y 0.5 ml de la "α" en tubo con 5 ml de medio de conjugación MC líquido. La mezcla se centrifugó durante 5 minutos a 1700 xg y se dejó en reposo a temperatura ambiente a 20°C durante 5 horas. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron dos veces por centrifugación y resuspensión en solución salina; haciéndose finalmente diluciones en solución salina fisiológica estéril desde  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$  y diseminando muestras de 0.1 ml de cada dilución en cajas de Petri con medio MG. Las cajas de Petri como es habitual se incubaron a 28°C durante 4 días antes de su observación.

### 5. 3. Técnica de micromanipulación para cruzar levaduras

Parte de los cruces realizados así como de la obtención de ascosporas, se llevaron a cabo con la ayuda del micromanipulador Leitz (Wetzlar) Microscopio Laborlux 2, siguiendo fundamentalmente los siguientes pasos:

#### 5. 3. 1. Preparación de la cámara de cultivo

La cámara de cultivo de la casa Leitz, de cuarzo, tiene 5 mm. de altura interior y se ha utilizado previa esterilización con luz U.V., a modo de "camara húmeda" (gota en suspensión). Los cubreobjetos de 35 x 30 milímetros, en donde se encuentra el medio de cultivo y la suspensión de levaduras, se pegan por su cara inferior a las tiras de cristal de la cámara con aceite de vaselina para impedir posibles desprendimientos durante el trabajo.

#### 5. 3. 2. Obtención de las microagujas

Las microagujas de punta recta se obtienen a partir de capilares normalizados de cristal de aproximadamente 1 mm de diámetro exterior, utilizando el aparato formador de agujas de la

casa Leitz, de Du Bois.

Sin embargo para la realización de este trabajo es necesario que dichas microagujas tengan la punta curva, ya que se aproximan a la suspensión de levaduras desde abajo; ello se consigue mediante un micromechero, consistente en un mechero Bunsen en el cual se ha sustituido el tubo de la llama por una aguja de inyecciones cortada y rectificadas que se adapta al mechero mediante un trozo corto de tubería flexible.

### 5.3.3. Cruce de estirpes haploides

Sobre el cubreobjetos antes descrito, se coloca una película muy fina de agar purificado, sin otros nutrientes, la cual no permite el crecimiento de células haploides auxótrofas. En los bordes opuestos de la película se ponen con el asa de platino dos finas bandas de las suspensiones de células a cruzar, que previamente han estado una noche en reposo para que dejen de gemar.

Una vez colocadas las dos suspensiones sobre la película de agar, se dejan durante 3 horas, con objeto de que pueda difundir el factor sexual de las células  $\alpha$ , que se produce durante la conjugación al estar presentes las células tipo " $\alpha$ ". Se ha visto que sin este tiempo de espera la eficacia de la conjugación

ción, cuando se produce, es mucho menor.

Pasado este tiempo se procede a la unión física célula a célula de las estirpes a cruzar, mediante la microaguja y utilizando para su espaciado y localización las coordenadas de la platina del microscopio.

Como norma general se suelen hacer de 5 a 6 cruces en cada cubreobjetos con idea de que no se mezclen las colonias a que darán lugar los cigotos que se formen.

En el esquema 1, se representa gráficamente la colocación del cubreobjetos sobre la cámara de cultivo y de las estirpes en el agar.

Una vez efectuados los cruces, la película de agar se desprende cuidadosamente del cubre objetos y se deposita sobre la superficie de una caja de Petri con medio MG, que posteriormente se incuba en las condiciones ordinarias.

Las colonias que crecen se pasan a medio preesporulante pE durante 72 horas a 28°C y con agitación constante, para obtener masa de células diploides. El cultivo se centrifuga a 2.600 g durante 5 minutos y el sedimento se resuspende y diluye en medio esporulante líquido E, incubándolo durante 6-7 días a 28°C y con agitación continua. Transcurrido este tiempo se observan al microscopio los cultivos que han esporulado, desechando aquellos que no lo hacen por proceder de cigotos  $\rho^+$ .

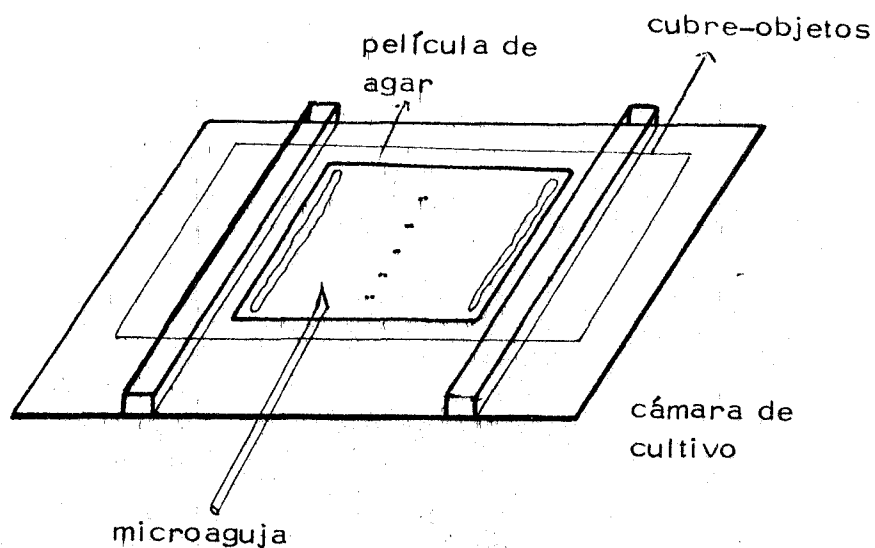
En la esporulación las células diploides dan por lo general ascas con 4 ascosporas, que son las que interesan en este trabajo para determinar la segregación del carácter en estudio.

#### 5.3.4. Disección de ascas

Las ascas recogidas tras la esporulación de los cigotos, se resuspenden en tampón citrato fosfato pH 7 y 0.02 M, y después de añadir pronasa a la suspensión hasta una concentración de 5 mg/ml, ésta se incuba durante una noche con el fin de que el enzima debilite la pared de las ascas.

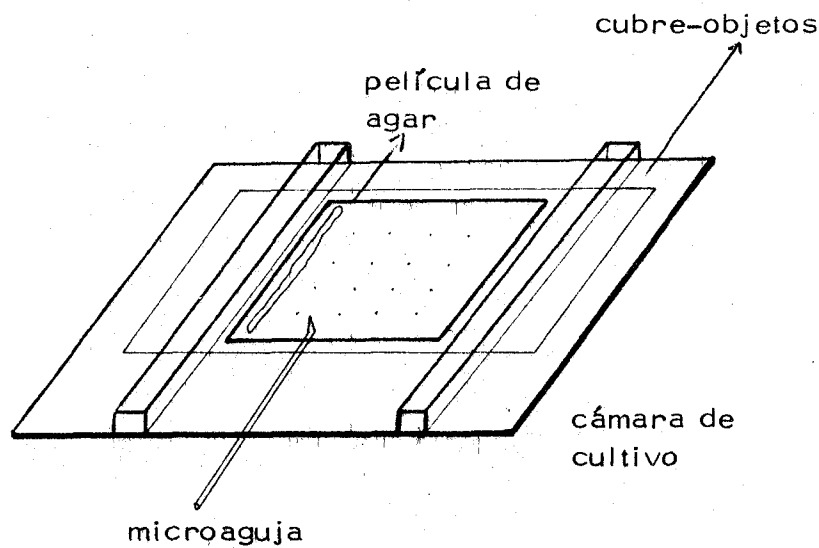
La disección se realiza ayudándose de la microaguja curva, separando así las 4 ascosporas de cada asca y alineándolas en filas de cuatro sobre la película de agar, a distancias aproximadamente iguales, según muestra el esquema 2 y procediendo posteriormente igual que en la obtención de cigotos pero disponiendo en este caso la película de agar sobre un medio completo.

Esquema 1. -



Técnica de cruce mediante micromanipulación

Esquema 2. -



Técnica de disección de ascas y aislamiento de ascosporas mediante micromanipulación

## 6. DETERMINACION DEL PORCENTAJE DE CELULAS $\text{RHO}^-$ EN CULTIVOS ESTACIONARIOS DE ESTIRPES $\text{RHO}^+$

El porcentaje de células  $\text{rho}^-$  en cultivos estacionarios de estirpes  $\text{rho}^+$  se llevó a cabo tanto para determinar la estabilidad de las razas empleadas y variación de la misma en las distintas experiencias realizadas, como para poder efectuar las correcciones oportunas en el cálculo de la supresividad de las estirpes  $\text{rho}^-$  empleadas (apartado 8 de este capítulo).

En todos los casos se partió de cultivos de 48 horas de levadura en medio NLG, a partir de los cuales se prepararon suspensiones con 2.000 - 3.000 células/ml en solución salina mediante las diluciones adecuadas de suspensiones madres, cuyas concentraciones en células se calcularon por recuento en cámara de Thomas. El porcentaje de células  $\text{rho}^-$  de las citadas suspensiones se determinó diseminando muestras de 0.1 ml de las mismas en cajas de Petri con medio NLG y contando, después de la incubación adecuada, el número total de colonias aparecidas y el de colonias deficientes respiratorias, diferenciables como se ha dicho por su menor tamaño.

Aunque con menor frecuencia, también se ha empleado para la determinación del porcentaje de células  $\text{rho}^-$ , el mé

todo del cloruro trifeniltetrazolio. En este último caso las muestras se diseminaron en medip MG, procediéndose después según la técnica descrita.

En los dos casos, los recuentos se efectuaron con ayuda de un contador de colonias Gallenkamp XC-300.

Una vez efectuado el recuento, el porcentaje de células deficientes respiratorias se calcula:

$$\% \text{ rho}^- = \frac{\text{n}^\circ \text{ colonias rho}^-}{\text{n}^\circ \text{ total colonias}} \times 100$$



## 7. DETERMINACION DE LA FRECUENCIA DE MUTACION ES - PONTANEA

Se llevó a cabo de acuerdo con la técnica de Ogur et al (1959). Estos autores han podido demostrar que el tanto por uno de mutantes deficientes respiratorios presentes en un cultivo de una estirpe  $\rho^+$  en un medio líquido, con un sustrato de carbono que no pueda ser utilizada por fermentación, es numéricamente igual a la frecuencia de mutación de la misma (mutaciones  $\rho^-$  producidas por célula y por división).

La técnica es como sigue: matraces Erlenmeyer de 100 ml con 30 ml de medio NL se inoculan con 0.1 ml de un cultivo de 24 horas de la levadura  $\rho^+$  en medio NG. Los matraces se incuban durante 40 horas a 28°C con agitación continua y al cabo de este tiempo el cultivo se diluye ( $10^{-5}$  -  $10^{-6}$ ) hasta una concentración de 2.000 - 3.000 células/ml y se procede a determinar la proporción de células  $\rho^-$  bien por siembra en medio NLG o bien por el método del cloruro de trifenil tetrazolio mediante la técnica ya descrita.

## 8. DETERMINACION DE LA SUPRESIVIDAD DE LAS ESTIRPES RHO<sup>-</sup>

Se ha seguido el método propuesto por Sherman y Ephrussi (1962) en el que el valor de la supresividad de la estirpe rho<sup>-</sup> se expresa por un índice, S, derivado de la siguiente fórmula:

$$S \% = \frac{X - Y}{1 - Y} \times 100$$

donde X es el tanto por uno de los cigotos rho<sup>-</sup> que resultan de un cruce (rho<sup>+</sup> por rho<sup>-</sup>) e Y es el tanto por uno de mutantes rho<sup>-</sup> presentes en cultivos en fase estacionaria de la estirpe rho<sup>+</sup>.

El valor de Y se calculó por la técnica descrita en el apartado 6.

Para calcular el valor de X se efectuó en cada caso el cruce (rho<sup>+</sup> por rho<sup>-</sup>) oportuno, mediante las técnicas descritas y a continuación se determinó la proporción de cigotos rho<sup>-</sup> bien por siembra en medio MG seguida de tratamiento con CTT, según la técnica descrita para la determinación del porcentaje de células rho<sup>-</sup> (DR) en cultivos estacionarios de una estirpe rho<sup>+</sup> o bien por siembra en medio MLG.

## 9. ESPORULACION DE ESTIRPES DIPLOIDES Y OBTENCION Y SELECCION DE ASCOSPORAS

Se ha seguido la técnica de Rousseau y Halvorson , (1969) que comprende las siguientes etapas:

### 9.1. Esporulación

La levadura diploide objeto de ensayo, se cultiva a 28°C en medio de preesporulación líquido, pE, durante 72 horas en agitación, con el fin de obtener masa de células. El cultivo se somete a centrifugación a 2000 xg durante 5 minutos, en condiciones de esterilidad, y el sedimento se resuspende y diluye en medio esporulante líquido E, hasta una concentración de  $10^7$  -  $10^8$  cel/ml y se reparte en matraces Erlenmeyer de 250 ml, a razón de 75 ml de medio en cada matraz. Los matraces se incuban durante 6-7 días a 28°C en agitación continua (140 rev./min.). Transcurrido este tiempo se puede observar al microscopio que más del 90% de las células han esporulado, dando lugar a ascas con 4 ascosporas la mayoría, aún cuando también se observan de 2 y 3 ascosporas. El cultivo esporulado se recoge por centrifugación a 2.600 xg durante 5 minutos.

## 9.2. Rotura de las ascas y obtención de las ascosporas

Las células recogidas en el proceso anterior se re-suspenden en tampón citrato-fosfato pH 7, 0.02M, a una concentración de  $10^9 - 10^{10}$  cel/ml; se añade pronasa hasta una concentración de 5 mg/ml y la suspensión se incuba durante un noche a 28°C para que el enzima pueda actuar sobre la pared del asca. Terminada la incubación se añade Tween 80 hasta una concentración del 1% para facilitar la dispersión de las ascosporas liberadas y, finalmente se completa la ruptura de las cubiertas en una prensa francesa, forzando el paso de la suspensión a través de un orificio de  $1000 \mu\text{m}^2$  a una presión de  $7.000 \text{ kg/cm}^2$  y manteniendo un flujo de 20 - 25 ml/min.

La suspensión obtenida después del tratamiento se deja en reposo durante unos minutos, a fin de que sedimenten las ascas no rotas y células no esporuladas, quedando en la fase intermedia las ascosporas libres y en la superior las cubiertas vacías de las mismas.

Todas estas manipulaciones han de hacerse en condiciones que aseguren la esterilidad de la suspensión.

## 9.3. Selección de estirpes haploides a partir de las ascosporas

La suspensión de ascosporas obtenida tras los tra-

tamientos arriba indicados, se diluye convenientemente en solución salina fisiológica y se disemina sobre cajas de Petri, con el medio adecuado para cada experiencia; las placas se incuban a 28°C durante 3-4 días, tiempo suficiente para que aparezcan las colonias fruto de la germinación de las ascosporas, colonias que por el procedimiento ordinario se trasladan a tubos con medio agar-NG.

Como norma, se seleccionaron las colonias de tamaño intermedio, ya que las de menor tamaño suelen corresponder a estirpes  $\rho^-$  y las más grandes proceden de ascas o células diploides residuales.

## 10. COMPROBACION DEL CARACTER HAPLOIDE O DIPLOIDE DE UNA ESTIRPE

La técnica seguida para comprobar la haploidía o diploidía de una estirpe ha sido someterla al proceso de esporulación, descrito en el apartado 9.1. Si transcurrido el tiempo necesario después de poner las células en medio esporulante no se observa esporulación de las mismas con formación de ascas, se considera que dicha estirpe es haploide.

En este trabajo sólo ha sido necesario comprobar el carácter haploide o diploide en estirpes  $\rho^+$  lo que ha facilitado grandemente el trabajo, ya que por este método no se puede conocer dicho carácter en células deficientes respiratorias, debido a la incapacidad que presentan este tipo de células para esporular.

## 11. CURVAS DE CRECIMIENTO DE LAS ESTIRPES HAPLOIDES DE S. CEREVISIAE

A fin de conocer la dinámica del crecimiento de algunas estirpes empleadas en este trabajo, se obtuvo la curva de crecimiento de las mismas en medio líquido NG.

La técnica seguida se describe a continuación:

Para poder realizar una curva patrón de crecimiento de forma que se repitan las mismas condiciones de cultivo, es necesario que la inoculación inicial sea prácticamente igual en cada caso; para ello se normalizó el inóculo de partida de la siguiente forma:

Se partió siempre de cultivos de 48 h. de la estirpe a ensayar, con los que se inocularon tubos con 5 ml de medio NG líquido, que se mantuvieron en agitación durante 24 h (caso de  $\rho^+$ ) ó 48 h (caso de estirpes  $\rho^-$ ) a 28°C tiempo en que se alcanza la fase de crecimiento estacionario.

A partir de estos cultivos, se tomaron muestras de 0.3 ml con lo que se inocularon matraces Erlenmeyer de 100 ml conteniendo 20 ml de medio NG. El crecimiento se siguió mediante la determinación periódica de la absorbancia a 650 nm. Para facilitar las determinaciones, los matraces empleados poseían en la ba

se una tubuladura lateral que permitía la lectura directa de la absorbancia en Spectronic - 20 sin necesidad de destapar el matraz.



## EXPERIENCIAS Y RESULTADOS



# 1. ESTUDIOS SOBRE ESTABILIDAD RESPIRATORIA Y RESISTENCIA A LA SUPRESIVIDAD DE ESTIRPES HAPLOIDES DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE

## 1.1. Experiencias previas

Consistieron en determinar la estabilidad respiratoria de las estirpes originales de que se disponía en nuestro laboratorio y en confirmar la existencia o no de una relación entre la misma y su resistencia a la supresividad frente a distintos mutantes  $\rho^-$  espontáneos o inducidas por tratamientos con mutágenos. Como se infiere de los resultados que se exponen a continuación, de las tres estirpes originales, las dos "a" mostraron una marcada inestabilidad, mientras que la estirpe " $\alpha$ " demostró poseer una gran estabilidad respiratoria. Igualmente se pudo establecer en principio, que las estirpes con alto grado de estabilidad muestran una marcada resistencia a la supresividad de mutantes  $\rho^-$ .

## 1.2. Estabilidad respiratoria de las estirpes de S. cerevisiae originales

Como se indica en el apartado oportuno, las estir-

pes de partida empleadas a lo largo de este trabajo, fueron la Sb-2, SER-19 y X-3, las dos primeras con un genotipo  $\underline{a}$ ,  $\underline{ade}_1$ ,  $\underline{his}_2$ ,  $\rho^+$  y la tercera  $\underline{\alpha}$ ,  $\underline{tri}_1$ ,  $\underline{his}_2$   $\rho^+$

La estabilidad se determinó estudiando tanto la frecuencia de mutación a  $\rho^-$  como el porcentaje de células  $\rho^-$  en cultivos en fase estacionaria, sobre medios con glucosa como fuente de carbono, de acuerdo con las técnicas descritas en el capítulo anterior.

Los resultados se exponen en la tabla 1, y demuestran que las estirpes Sb-2 y SER19 son inestables, mientras que la X-3 por el contrario, presenta un alto grado de estabilidad.

Tabla 1. - Frecuencia de mutación a  $\rho^-$  y porcentaje de mutantes  $\rho^-$  en cultivos en fase estacionaria, de las estirpes originales empleadas en este trabajo. \*

Estirpes	Tasa de mutación a $\rho^-$ ( $\times 10^2$ )	Células $\rho^-$ en cultivos en fase estacionaria (%)
SER19	6.4 $\pm$ 0.17	16.1 $\pm$ 0.15
Sb-2	5.2 $\pm$ 0.10	16.7 $\pm$ 0.32
X-3	1 $\pm$ 0.08	1.5 $\pm$ 0.20

\* Los resultados son la media de 10 experiencias

1.3. Estabilidad de clones seleccionadas al azar, a partir de las estirpes SER19 y Sb-2

Los resultados obtenidos en la experiencia anterior en relación con las estirpes SER19 y Sb-2, indican como ha quedado expuesto, que las citadas estirpes son inestables desde el punto de vista respiratorio; esta inestabilidad, no obstante, puede ser una constante fisiológica de las estirpes ó el resultado me dio de la estabilidad respiratoria de cada uno de los individuos que componen la población.

1.3.1. Al objeto de comprobar este extremo, se realizaron una serie de experiencias en las que a partir de cultivos en fase estacionaria sobre medio NG, de las estirpes SER19 y Sb-2, por diseminación de los mismos en placas de NGL, se aislaron al azar en cada caso 25 clones, cuyo fenotipo  $\rho^+$  se determinó comprobando su capacidad para crecer en medio NL. Los clones procedentes de la estirpe SER19 se designaron como SERg1, SERg2... SERg25, y los de la estirpe Sb-2 como Sbg1, Sbg2... Sbg25.

El grado de estabilidad respiratoria de cada uno de ellos se comprobó en este caso determinando solamente el porcentaje de células  $\rho^-$  presentes en cultivos en fase estacionaria.

Los resultados obtenidos para las estirpes SER19 y Sb-2, junto con la media y la dispersión de los mismos, se exponen respectivamente en las tablas 2 y 3.

Tabla 2. - Variabilidad del grado de estabilidad respiratoria de clonos seleccionados al azar, a partir de la estirpe SER19. \*

Clonos	Células rho <sup>-</sup> (%)	Clonos	Células rho <sup>-</sup> (%)
SERg 1	25.7	SERg 15	38.4
SERg 2	19	SERg 16	16.9
SERg 3	13.7	SERg 17	19.1
SERg 4	25	SERg 18	37.7
SERg 5	20.2	SERg 19	25.3
SERg 6	19.8	SERg 20	19.4
SERg 7	34.6	SERg 21	29.7
SERg 8	22.2	SERg 22	29.4
SERg 9	21.0	SERg 23	27.1
SERg 10	18.5	SERg 24	24.8
SERg 11	32.2	SERg 25	23.7
SERg 12	30.5		
SERg 13	51.2	$\bar{x}$	26.7 <sup>+</sup> - 1.76
SERg 14	41.7	$\sigma$	8.62

\* Porcentaje de células rho<sup>-</sup> de la estirpe SER19 %:16.1

Tabla 3. - Variabilidad del grado de estabilidad respiratoria de clones seleccionados al azar a partir de la estirpe Sb-2. \*

Clonos	Células rho <sup>-</sup> (%)	Clonos	Células rho <sup>-</sup> (%)
Sbg 1	11.5	Sbg 15	14.1
Sbg 2	18.3	Sbg 16	39.2
Sbg 3	37.9	Sbg 17	11.8
Sbg 4	29.6	Sbg 18	15.1
Sbg 5	17.8	Sbg 19	24
Sbg 6	16	Sbg 20	13.5
Sbg 7	16.1	Sbg 21	16.7
Sbg 8	32.8	Sbg 22	3
Sbg 9	46.8	Sbg 23	14.3
Sbg 10	22.1	Sbg 24	15.8
Sbg 11	11.8	Sbg 25	14.4
Sbg 12	12.6		
Sbg 13	11.9	X	19.38 <sup>+</sup> - 2
Sbg 14	17.1	σ	10.04

\* Porcentaje de células rho<sup>-</sup> de la estirpe Sb-2 : 16.7

Como puede observarse todos los clones aislados a partir de las dos estirpes estudiadas fueron también inestables

desde el punto de vista respiratorio. Solamente en un caso, clono Sbg 22, se encontraron valores de porcentaje de mutantes rho<sup>-</sup> próximos a los de una estirpe estable del tipo de X-3 estudiada anteriormente.

Igualmente salta a la vista que el grado de estabilidad de los distintos clones presentan en ambos casos una gran dispersión, como lo indica el hecho de que la varianza representa el 51.8% de la media en el caso de la Sb-2 y el 32.28% en el caso de SER19. Esto indica en principio, que la inestabilidad de las estirpes estudiadas es la resultante de la inestabilidad de cada uno de los individuos que componen la población, aunque no deja de ser sorprendente que en el caso de la SER19 el porcentaje medio de mutantes rho<sup>-</sup> de los clones estudiados sea notablemente superior al que muestra la citada estirpe.

1.3.2. Como ampliación de las experiencias anteriores y al objeto de comprobar si el grado de estabilidad respiratoria de los clones estudiados es, como en el caso de las estirpes de partida, resultante del que muestran los individuos que los integran, se repitieron las experiencias anteriores con dos clones procedentes de las estirpes Sb-2 y dos de la SER19 que, en cada caso fueron los que habían mostrado el mínimo y el máximo de estabilidad. En estas experiencias se seleccionaron 20 clones de cada cultivo.

Los resultados obtenidos para los clones Sbg 9, Sbg22,



SERg3 y SERg13, junto con la media y la dispersión de los mismos, se expone respectivamente en las tablas 4, 5, 6 y 7.

Tabla 4. - Variabilidad del grado de estabilidad respiratoria de clones seleccionados al azar a partir del clono Sbg9\*

Clonos	Células rho <sup>-</sup> (%)	Clonos	Células rho <sup>-</sup> (%)
Sbg 9-1	44	Sbg 9-14	39.46
Sbg 9-2	39.65	Sbg 9-15	57.1
Sbg 9-3	35.5	Sbg 9-16	39.5
Sbg 9-4	40.19	Sbg 9-17	43
Sbg 9-5	50.3	Sbg 9-18	45.95
Sbg 9-6	31.73	Sbg 9-19	37.5
Sbg 9-7	39.2	Sbg 9-20	47.2
Sbg 9-8	38.5		
Sbg 9-9	49.7		
Sbg 9-10	50.12	X	3.79 <sup>±</sup> 0.34
Sbg 9-11	45.48	σ	1.52
Sbg 9-12	57.2		
Sbg 9-13	38.4		

\* Porcentaje de células rho<sup>-</sup> del clono Sbg 9 : 46.8

Tabla 5. - Variabilidad del grado de estabilidad respiratoria de clones seleccionados al azar a partir del clono Sbg 22 \*

Clonos	Células rho <sup>-</sup> (%)	Clonos	Células rho <sup>-</sup> (%)
Sbg 22-1	2.16	Sbg 22-13	5.3
Sbg 22-2	5.4	Sbg 22-14	4.38
Sbg 22-3	4.9	Sbg 22-15	6.8
Sbg 22-4	5.3	Sbg 22-16	2.68
Sbg 22-5	2.38	Sbg 22-17	3.68
Sbg 22-6	2.9	Sbg 22-18	4.9
Sbg 22-7	2.75	Sbg 22-19	2.2
Sbg 22-8	6.5	Sbg 22-20	4.3
Sbg 22-9	1.26		
Sbg 22-10	2.78	X	3.79 <sup>+</sup> - 0.34
Sbg 22-11	2.2	σ	1.52
Sbg 22-12	3		

\* Porcentaje de células rho<sup>-</sup> del clono Sbg 22 : 3.15

Tabla 6. - Variabilidad del grado de estabilidad respiratoria de clones seleccionados al azar, a partir del clono SERg 3 \*

Clonos	Células rho <sup>-</sup> (%)	Clonos	Células rho <sup>-</sup> (%)
SERg 3-1	24.8	SERg 3-13	48.4
SERg 3-2	32.1	SERg 3-14	31.4
SERg 3-3	43.2	SERg 3-15	49.1
SERg 3-4	29.6	SERg 3-16	55.9
SERg 3-5	40	SERg 3-17	31.6
SERg 3-6	47.3	SERg 3-18	45.8
SERg 3-7	38.9	SERg 3-19	46.8
SERg 3-8	30.1	SERg 3-20	50.48
SERg 3-9	45.2		
SERg 3-10	52.4	X	41.9
SERg 3-11	44.9	σ	7.48
SERg 4-12	50.3		

\* Porcentaje de células rho<sup>-</sup> del clono SERg 3 : 13.7

Tabla 7.- Variabilidad del grado de estabilidad respiratoria de clones seleccionados al azar, a partir del clono SERg 13 \*

Clonos	Células rho <sup>-</sup> (%)	Clonos	Células rho <sup>-</sup> (%)
SERg 13-1	35.3	SERg 13-13	34
SERg 13-2	45.6	SERg 13-14	50
SERg 13-3	47.2	SERg 13-15	42.6
SERg 13-4	39.5	SERg 13-16	39
SERg 13-5	51.6	SERg 13-17	55
SERg 13-6	46.3	SERg 13-18	29.9
SERg 13-7	54.2	SERg 13-19	31.6
SERg 13-8	40.8	SERg 13-20	36.1
SERg 13-9	44.2		
SERg 13-10	45.7		
SERg 13-11	53	X	43.73 <sup>±</sup> 1.76
SERg 13-12	50.8	σ	7.48

\* Porcentaje de células rho<sup>-</sup> del clono SER 13 : 51.2

#### 1.4. Estabilidad respiratoria y resistencia a la supresividad

Como queda indicado, en esta etapa previa se trató de establecer si realmente existe una relación entre el grado de estabilidad respiratoria de las estirpes  $\rho^+$  haploides de S. cerevisiae y su resistencia a la supresividad. A tal fin fué necesario, en primer lugar, obtener estirpes  $\rho^-$  supresivas derivadas de las estirpes  $\rho^+$  originales.

Dado el alto porcentaje de mutantes espontáneos presentes en los cultivos de la estirpe Sb-2, todas las estirpes  $\rho^-$  de la serie "a" se obtuvieron por selección de aquellas, designándose como Sp-1, Sp-2, ...

Por lo que respecta a las estirpes  $\rho^-$  de la serie "α", parte se obtuvieron por selección entre los escasos mutantes espontáneos presentes en los cultivos de la estirpe X-3 y fueron designados como Xp-1, Xp-2, ... Xp-11 y parte se obtuvieron previa inducción, mediante tratamientos con anaranjado de acridina (AXp-1, AXp-2, ... AXp-10).

De todas estas estirpes, una vez comprobada su supresividad, solamente se han utilizado de manera continuada en este trabajo, las Xp-4, Xp-6, Xp-9, Xp-11 y AXp-10 de la serie "α" y las Sp-5, Sp-15, Sp-17, y Sp-18 de la serie "a", ya que las restantes o bien carecieron en absoluto de capacidad supresiva siendo idénticas, por tanto, en este aspecto, a par-

te de las utilizadas como se podrá observar a continuación, o bien mostraron una supresividad menor que la de las estirpes citadas.

Disponibles ya dichas estirpes  $\rho^-$ , se determinó en primer lugar la supresividad de las mismas frente a las estirpes  $\rho^+$  originales y los clones derivados de éstas, y cuyo grado de estabilidad se ha descrito en los apartados anteriores.

#### 1.4.1. Supresividad de diversas estirpes $\rho^-$ frente a las estirpes $\rho^+$ originales

Se determinó por la técnica descrita en el apartado ( 8 ) del capítulo anterior; los resultados obtenidos, expresados como  $S\%$ , se exponen en la tabla 8.

Como puede observarse de las estirpes  $\rho^-$  incluidas en dicha tabla, sólo mostraron capacidad supresiva las Xp-4 y AXp-10, en especial ésta última; las restantes, siguiendo el criterio adoptado por todos los investigadores que trabajan sobre el tema, deben ser consideradas como "neutras", al ser  $S\%$  inferior a 10.

Para no complicar innecesariamente la tabla solo se han incluido dos estirpes supresivas y dos estirpes neutras de la serie  $\alpha$ , y cuatro neutras de la serie  $a$ . Las restantes estirpes  $\rho^-$  aisladas o bien mostraron ser neutras o una supresividad menor que la de las dos estirpes incluidas. Hay que insistir, sin em

Tabla 8. - Grado de supresividad mostrado por diversas estirpes rho<sup>-</sup> en cruces con las estirpes Sb-2, SER 19 y X-3.

Estirpes rho <sup>+</sup>	Estirpes rho <sup>-</sup>	S%
Sb-2	Xp-4	29.3
Sb-2	Sp-9	0.4
Sb-2	Xp-11	2.1
Sb-2	AXp-10	59.9
SER 19	Xp-4	53.4
SER 19	Xp-9	0.12
SER 19	Xp-11	1.9
SER 19	AXp-10	51.3
X-3	Sp-5	4
X-3	Sp-15	2
X-3	Sp-17	3
X-3	Sp-18	0

bargo, que a pesar de haber aislado un gran número de estirpes rho<sup>-</sup> de la serie a (Sp), en ningún caso pudo demostrarse supresividad alguna frente a la estirpe X-3.

Tabla 9. - Resistencia a la supresividad de la estirpe AXP-10 de  
clonos rho<sup>+</sup> derivados de la estirpe Sb2 \*\*

Clonos	% R **	Clonos	% R **
Sbg 1	39.6	Sbg 15	36.7
Sbg 2	34.2	Sbg 16	63
Sbg 3	37.9	Sbg 17	37.8
Sbg 4	79.7	Sbg 18	30.5
Sbg 5	36.5	Sbg 19	44.9
Sbg 6	46.7	Sbg 20	38.3
Sbg 7	37.6	Sbg 21	40.6
Sbg 8	54.2	Sbg 22	81.1
Sbg 9	77.4	Sbg 23	37.5
Sbg 10	40.9	Sbg 24	37.7
Sbg 11	38.1	Sbg 25	36.6
Sbg 12	38.8		
Sbg 13	32.3	X	47.56 <sup>+</sup> - 3.37
Sbg 14	48.3	σ	17.83

\*\* % R = 100 - %S de AXP-10

\* % R Sb2 ; 40.1



Tabla 10. - Resistencia a la supresividad de la estirpe AXp-10 de clones rho<sup>+</sup> derivados de la estirpe SER 19 \*

Clonos	%R**	Clonos	%R**
SERg 1	58.42	SERg 15	76.7
SERg 2	50.75	SERg 16	88
SERg 3	66.52	SERg 17	57.3
SERg 4	53	SERg 18	84.1
SERg 5	50.63	SERg 19	52.8
SERg 6	51.75	SERg 20	53.3
SERg 7	63.3	SERg 21	55.1
SERg 8	47.8	SERg 22	60.1
SERg 9	62.4	SERg 23	91.3
SERg 10	61.8	SERg 24	68.3
SERg 11	64.7	SERg 25	42.9
SERg 12	59.5		
SERg 13	31.4	X	60.53 <sup>+</sup> - 2.72
SERg 14	76.7	σ	13.62

\*\* %R = 100 - %S de AXp-10

\* %R SER 19 : 48.7

Tabla 11. - Resistencia a la supresividad de la estirpe AXP-10  
de clones rho<sup>+</sup> derivados de la estirpe Sbg-22 \*

Clonos	% R <sup>**</sup>	Clonos	% R <sup>**</sup>
Sbg 22-1	92.83	Sbg 22-12	97.13
Sbg 22-2	95.6	Sbg 22-13	94.83
Sbg 22-3	90.4	Sbg 22-14	93.11
Sbg 22-4	100	Sbg 22-15	96.75
Sbg 22-5	95.3	Sbg 22.16	97.44
Sbg 22-6	94.75	Sbg 22.17	96.69
Sbg 22-7	98.72	Sbg 22.18	98.8
Sbg 22-8	100	Sbg 22.19	95.3
Sbg 22-9	93.43	Sbg 22.20	90.6
Sbg 22-10	93.63		
Sbg 22-11	95.4	X	93.53 <sup>+</sup> - 0.61
		σ	2.74

\*\* % R = 100 - %S de AXP-10

\* % R Sbg-22 : 81.1 ; % rho<sup>-</sup> : 3.15

Tabla 12. - Resistencia a la supresividad de la estirpe AXp-10 de clones rho<sup>+</sup> derivados de la estirpe SERg 13 \*

Clonos	%R**	Clonos	%R**
SERg 13-1	46.4	SERg 13-13	33.2
SERg 13-2	62.9	SERg 13-14	55.6
SERg 13-3	58.7	SERg 13-15	48.15
SERg 13-4	35.9	SERg 13-16	42.5
SERg 13-5	70.5	SERg 13-17	56.5
SERg 13-6	49.2	SERg 13-18	46.8
SERg 13-7	64.2	SERg 13-19	53
SERg 13-8	37	SERg 13-20	65.26
SERg 13-9	86.2		
SERg 13-10	52.4	X	54.32 <sup>+</sup> - 2.91
SERg 13-11	68.7	σ	13.01
SERg 13-12	53.26		

\*\* %R = 100 - %S de AXp-10

\* %R SERg 13 : 31.4

Tabla 13.- Resistencia a la supresividad de la estirpe AXp-10  
de clones derivados de la estirpe Sbg 9 \*

Clonos	% R **	Clonos	% R **
Sbg 9-1	78.22	Sbg 9-13	37.1
Sbg 9-2	66.5	Sbg 9-14	71.62
Sbg 9-3	72.1	Sbg 9-15	100
Sbg 9-4	56.1	Sbg 9-16	83.31
Sbg 9-5	61.2	Sbg 9-17	43
Sbg 9-6	22.7	Sbg 9-18	45.95
Sbg 9-7	85.53	Sbg 9-19	37.5
Sbg 9-8	71.1	Sbg 9-20	79.4
Sbg 9-10	94.2		
Sbg 9-11	47.7	X	76.14 <sup>+</sup> - 50.5
Sbg 9-12	57.2	G	22.58

\*\* %R : 100 - %S de AXp-10

\* %R Sbg 9 : 77.4

1.4.2. Resistencia a la supresividad de la estirpe AXp-10 de clones  $\rho^+$  derivados de las estirpes Sb-2 y SER19

En la experiencia anterior se ha puesto de manifiesto como las estirpes Xp-4 y AXp-10 son supresivas para las estirpes  $\rho^+$ , Sb-2 y SER19, al objeto de comprobar si su grado de supresividad es un caracter fijo de las mismas o si por el contrario varía con el tipo de estirpes  $\rho^+$  frente a las que se cruzan, se proyectaron una serie de experiencias en las que la estirpe AXp-10 se cruzó primeramente con los clones de las series Sbg y SERg y posteriormente, con la serie Sbg22 y SERg13, estas últimas derivadas respectivamente, como ha quedado expuesto de un clono relativamente estable y de otro inestable.

En cada caso la determinación de la supresividad de la estirpe AXp-10 se llevó a cabo en la forma acostumbrada; los resultados que se exponen en las tablas 9, 10, 11 y 12 se expresaron en este caso como % de resistencia a la supresividad (%R) de la estirpe AXp-10 de los distintos clones  $\rho^+$  ensayados, calculada dicha resistencia como  $\%R=100-S\%$  de la estirpe AXp-10.

De los resultados obtenidos se deduce claramente que el grado de supresividad de una estirpe supresiva como la AXp-10, varía entre límites muy amplios según la estirpe  $\rho^+$  frente a la que se determina el mismo. Es por ello y así se ha recogido en las tablas anteriores que, supuesto que una estirpe sea supresiva, es más correcto hablar de resistencia de las estirpes  $\rho^+$  a su acción, que de su porcentaje de supresividad, ya que este

dato es totalmente aleatorio y depende de la estirpe  $\rho^+$  frente a la que se determine, hasta el punto de que, como se aprecia claramente en los resultados expuestos, una estirpe supresiva puede comportarse en ocasiones como neutra.

De otra parte, comparando la resistencia a la supresividad de los clones  $\rho^+$  ensayados, con su grado de estabilidad, (tablas 2, 3, 4, 5, 6 y 7 con las tablas 9, 10, 11, 12 y 13) puede afirmarse que existe una estrecha relación entre el grado de estabilidad de los citados clones y su resistencia a la supresividad. Esta afirmación no debe tomarse en el sentido de que haya sido posible establecer una correlación matemática en la que la resistencia sea función de la estabilidad, sino en el de que todas las estirpes ensayadas relativamente estables (clonos Sbg 22 y todos los derivados de él) muestran una gran resistencia a la supresividad de la estirpe AXp-10, de manera que esta se comporta prácticamente como neutra con respecto a las mismas.

Este fenómeno puede explicar el hecho de que haya sido imposible encontrar una estirpe supresiva frente a X-3, si se tiene en cuenta el alto grado de estabilidad de esta estirpe.

#### 1.4.3. Resistencia a la supresividad de la estirpe Xp-4 de diversas $\rho^+$ empleadas en este trabajo

Los resultados anteriores se obtuvieron mediante el

empleo de la estirpe AXp-10, obtenida mediante tratamiento de la X-3 con anaranjado de acridina; antes de pasar a otros estudios se quiso comprobar si otros mutantes  $\rho^-$  supresivas de origen diverso se comportaban de igual forma. Para ello se determinó la supresividad de la estirpe de la estirpe Xp-4 obtenida a partir de un mutante espontáneo de la estirpe X-3, frente a estirpes  $\rho^+$  de estabilidad elevada.

Los resultados se exponen en la tabla 14 y muestran que, al igual que en casos anteriores, las estirpes estables son resistentes al efecto supresivo de la estirpe ensayada.

Tabla 14. - Resistencia a la supresividad de la estirpe Xp-4, de varias  $\rho^+$  con distinto grado de estabilidad respiratoria.

Estirpes $\rho^+$	Frecuencia de mutación a $\rho^-$ ( $\times 10^{-2}$ )	Mutantes $\rho^-$ en cultivos en fase estacionaria (%)	%RS
Sb-2	5.2	16.7	70.7
SER19	6.4	16.1	72.1
Sbg 22-9	0.5	1.26	90
SXg 4-27	0.2	0.67	95.8
SXg 4-125	1.48	4.7	82.6

## 2. ESTABILIZACION GENETICA DE ESTIRPES $\rho^+$ INESTABLES Y REPERCUSION DE LA MISMA SOBRE SU RESISTENCIA A LA SUPRESIVIDAD

Aún cuando, como ha quedado expuesto en el apartado anterior, es posible obtener por segregación mitótica de las estirpes inestables, clones con una estabilidad mayor que la estirpe original, -caso del clono Sbg 22- dicha estabilidad no alcanzó nunca los niveles mostrados por la estirpe X-3. Por esta razón la estabilización de las estirpes inestables se llevó a cabo teniendo en cuenta trabajos previos de Gonzalez (1974) y Gonzalez y Montoya (1976) que habían mostrado que la progenie  $\rho^+$  haploide, procedentes de cigotos obtenidos en cruces entre estirpes  $\rho^+$  inestables con  $\rho^-$  supresivas presentaban una estabilidad respiratoria mucho mayor que la estirpe  $\rho^+$  de partida.

Como estirpes de partida se emplearon la AXp-10 (a, tri<sub>1</sub>, his<sub>3</sub>)  $\rho^+$  y la SER19 (a, ade<sub>1</sub>, lis<sub>2</sub>)  $\rho^+$ , esta última con una frecuencia de mutación espontánea a  $\rho^-$  de  $6.4 \times 10^{-2}$  ce./gen. y una resistencia a la supresividad de la estirpe AXp-10 del 48.7%.

El cruce entre las citadas estirpes, se llevó a cabo por el procedimiento ordinario descrito en el apartado (5.2) del capítulo anterior y los cigotos  $\rho^+$  prototrofos se seleccio-



naron mediante diseminación en medio ML.

A partir de tres cigotos escogidos al azar, se obtuvieron los cultivos correspondientes que se hicieron esporular y se manipularon en la forma descrita en el apartado (9) del capítulo anterior, a fin de obtener a partir de cada una de ellos una gran suspensión de ascosporas.

Dado que el objeto de la experiencia era obtener es tirpes haploides con los mismos marcadores que la estirpe SER19 de partida, a fin de que fuera posible el retrocruzamiento con la estirpe AXp-10, fué necesario un proceso de selección de las ascosporas obtenidas en cada uno de los tres cigotos, que comprendía las siguientes etapas:

- A) diseminación de las suspensiones de ascosporas en medio ML,  $ade^+$ ,  $lis^+$ , en el que crecen las ascosporas  $\rho^+$  prototrofas y auxótrofas para los marcadores ade y lis. Así se obtuvieron 150 cultivos a partir de las colonias procedentes del cigoto número 4 y 50 en cada caso las procedentes de los cigotos números 5 y 6.
- B) siembra de las estirpes seleccionadas en medio MG,  $ade^+$  y MG,  $lis^+$ , se desecharon aquellas que crecieron en los dos medios (prototrofas), o en uno de ellos (auxótrofas para el marcador  $ade_1$  ó  $lis_2$  respectivamente).
- C) cruce de las estirpes no desechadas con la AXp10 y disemi-

nación posterior en medio ML. Solo se seleccionaron las estirpes que dieron lugar a cigotos prototrofos, cuyo genotipo de acuerdo con la técnica expuesta mostraba ser (a, ade<sub>1</sub>, lis<sub>2</sub>) rho<sup>+</sup>

Mediante la técnica descrita se seleccionaron a partir de las 300 colonias examinadas, sólo 10 estirpes con el genotipo citado; seis procedentes del cigoto número 4 (SXg4-14, SXg4-19, SXg4-28, SXg4-31, y SXg4-125); una estirpe procedente del cigoto número 5 (SXg5-11), y tres procedentes del cigoto número 6 - (SXg6-9, SXg6-48 y SXg6-50).

A todas ellas se les determinó su frecuencia de mutación espontánea a rho<sup>-</sup>, así como el porcentaje de células rho<sup>-</sup> en cultivos en fase estacionaria en medio NG. Igualmente, mediante retrocruzamientos con la estirpe AXp-10, se determinó la resistencia a la supresividad de la misma.

Los resultados se exponen en la tabla 5, y muestran que salvo dos excepciones, todas las estirpes seleccionadas tienen una gran estabilidad y todas ellas fueron mucho más resistentes a la supresividad de la estirpe AXp-10.

Al objeto de confirmar los resultados obtenidos y comprobar si el proceso de estabilización y de aumento de resistencia a la supresividad se acentúa en un segundo cruce con una estirpe supresiva, se repitió el mismo tipo de experiencia partiendo de una de las estirpes seleccionadas en la experiencia anterior y la misma

Tabla 15. - Frecuencia de mutación espontánea a rho<sup>-</sup>, porcentaje de células rho<sup>-</sup> en cultivos en fase estacionaria y resistencia a la supresividad de la estirpe AXp-10, de las estirpes rho<sup>+</sup> haploides, procedentes de un cruce SER19\* por AXp-10.

Estirpes	Frecuencia de mutación a rho <sup>-</sup> (x10 <sup>-2</sup> )	células rho <sup>-</sup> en cultivos en fase estacionaria (%)	RS (%)
SXg4-14	2	2.77	72
SXg4-19	5.5	6.6	87.8
SXg4-27	0.2	0.67	91.1
SXg4-28	10.3	18.06	83.5
SXg4-31	1.28	1.5	93.2
SXg4-125	1.48	4.7	96
SXg5-11	1.66	2.84	96
SXg6-9	Indetectable	Indetectable	84.6
SXg6-48	0.94	0.9	75.3
SXg6-50	0.74	1.4	78.5
$\bar{X}$	2.41 <sup>+</sup> - 1	3.94 <sup>+</sup> - 1.69	85.8 <sup>+</sup> - 2.70
$\sigma$	3.16	5.34	10.75

\* RS : 48.7 ; tasa de mutación :  $6.4 \times 10^{-2}$  ; % rho<sup>-</sup> : 16.1

estirpe  $\rho^-$ , AXP-10 utilizada en el primer cruce. Como estirpe  $\rho^+$  de partida se eligió la SXg4-31, con una estabilidad del tipo de la que muestra la X-3 de forma natural.

Los pasos seguidos para la obtención y selección de las estirpes de esta segunda generación con genotipo igual a la  $\rho^+$  de partida fueron los mismos que anteriormente descritos. En el presente caso sin embargo se seleccionó al azar un sólo zigoto y a partir del mismo se obtuvieron en la etapa A) 85 estirpes, de las cuales sólo siete mostraron poseer el genotipo requerido (a, ade<sub>1</sub>, lis<sub>2</sub>)  $\rho^+$ , las designadas como S2Xg-10, -S2Xg-12, S2Xg-17, S2Xg-30, S2Xg-32, S2Xg-60, y S2Xg-65.

Como en el caso anterior a todas ellas se les determinó la frecuencia de mutación espontánea a  $\rho^-$ , porcentaje de células  $\rho^-$  en cultivos en fase estacionaria en medio NG y resistencia a la supresividad de la estirpe madre AXP-10.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 16.

Tabla 16. - Frecuencia de mutación espontánea a  $\rho^-$ , porcentaje de células  $\rho^-$  en cultivos en fase estacionaria y resistencia a la supresividad de la estirpe AXp-10 de estirpes  $\rho^+$  haploides procedentes de un cruce SXg4-31\* por AXp-10

Estirpes	Frecuencia de mutación a $\rho^-$ ( $\times 10^{-2}$ )	células $\rho^-$ en cultivos en fase estacionaria (%)	RS (%)
S2Xg-10	0.73	0.92	96
S2Xg-12	Indetectable	0.67	95.9
S2Xg-17	0.24	1.68	94
S2Xg-30	Indetectable	0.14	94.6
S2Xg-32	0.23	3.12	93.8
S2Xg-60	Indetectable	0.73	94.2
S2Xg-65	Indetectable	0	97
$\bar{X}$	$0.17 \pm 0.10$	$1.04 \pm 0.37$	$95.1 \pm 0.40$
$\sigma$	0.25	0.99	1.13

\* % RS = 93.2, Tasa de mutación = 1.28; %  $\rho^-$  : 1.5

### 3. NATURALEZA DE LOS DETERMINANTES GENÉTICOS QUE CONDICIONAN LA ESTABILIDAD RESPIRATORIA Y LA RE- SISTENCIA A LA SUPRESIVIDAD

En los apartados anteriores se ha podido demostrar que a partir de estirpes inestables pueden derivarse otras con una estabilidad mayor, en ocasiones muy acusada, tanto por segregación mitótica como mediante cruzamiento con una estirpe  $\rho^-$  y posterior esporulación de los cigotos obtenidos. En ambos casos las estirpes estabilizadas muestran una resistencia al poder supresivo de las estirpes  $\rho^-$  empleadas mucho mayor que la estirpe madre inestable, lo que indica que los mismos determinantes genéticos que condicionan la estabilidad respiratoria, son también los responsables de la resistencia a la supresividad.

Al objeto de determinar si los citados determinantes genéticos son de naturaleza citoplasmática, es decir el propio ADNm estabilizado, o cromosómica (al elelo cromosómico necesario para la estabilidad o conservación del ADNm), se ha analizado la segregación del fenotipo "estable" en la progenie haploide obtenida de cigotos  $\rho^+$  procedentes de cruces de una estirpe inestable y otra  $\rho^-$  supresiva. Posteriormente, para confirmar los resultados obtenidos en esta primera fase, se ha analizado la se-

Tabla 17. - Frecuencia de mutación espontánea a  $\rho^-$  de 98 estirpes  $\rho^+$  haploides procedentes del cigoto nº 1, obtenido de un cruce entre la estirpe inestable SER 19\* y la AXp-10 supresiva

Estirpes	Frecuencia de mutación a $\rho^-$ ( $\times 10^{-2}$ )	Estirpes	Frecuencia de mutación a $\rho^-$ ( $\times 10^{-2}$ )
SXg1-1	1.8	SXg1-18	0.18
SXg1-2	4	SXg1-19	5
SXg1-3	0.6	SXg1-20	2.1
SXg1-4	3.7	SXg1-21	1.4
SXg1-5	33.8	SXg1-22	10.08
SXg1-6	17.4	SXg1-23	3.2
SXg1-7	Indetectable	SXg1-24	0.89
SXg1-8	1.17	SXg1-25	0.75
SXg1-9	0.41	SXg1-26	Indetectable
SXg1-10	0.68	SXg1-27	1.7
SXg1-11	19.2	SXg1-28	2.33
SXg1-12	2.6	SXg1-29	0.27
SXg1-13	3	SXg1-30	19
SXg1-14	16.7	SXg1-31	1.28
SXg1-15	0.3	SXg1-32	26.4
SXg1-16	7.1	SXg1-33	Indetectable
SXg1-17	45.11	SXg1-34	0.67

.../...

Tabla 17. - (continuación)

Estirpes	Frecuencia de mutación a $\rho^-$ ( $\times 10^{-2}$ )	Estirpes	Frecuencia de mutación a $\rho^-$ ( $\times 10^{-2}$ )
SXg1-35	45	SXg1-56	2.08
SXg1-36	0.3	SXg1-57	0.37
SXg1-37	0.39	SXg1-58	6.23
SXg1-38	1.1	SXg1-59	1.38
SXg1-39	Indetectable	SXg1-60	25
SXg1-40	15	SXg1-61	16.21
SXg1-41	1.4	SXg1-62	0.2
SXg1-42	0.41	SXg1-63	Indetectable
SXg1-43	0.7	SXg1-64	3.7
SXg1-44	6.7	SXg1-65	Indetectable
SXg1-45	0.5	SXg1-66	0.41
SXg1-46	8.08	SXg1-67	0.7
SXg1-47	0.87	SXg1-68	28.26
SXg1-48	2.54	SXg1-69	0.17
SXg1-49	1.06	SXg1-70	5.9
SXg1-50	9.06	SXg1-71	0.49
SXg1-51	3.27	SXg1-72	Indetectable
SXg1-52	1.69	SXg1-73	1.81
SXg1-53	0.6	SXg1-74	1.01
SXg1-54	4.2	SXg1-75	0.46
SXg1-55	0.24	SXg1-76	0.88

.../...



Tabla 17. - (continuación)

Estirpes	Frecuencia de mutación a rho <sup>-</sup> (x10 <sup>-2</sup> )	Estirpes	Frecuencia de mutación a rho <sup>-</sup> (x10 <sup>-2</sup> )
SXg1-77	1.69	SXg1-91	8.1
SXg1-78	3.12	SXg1-92	1.1
SXg1-79	20.1	SXg1-93	2.42
SXg1-80	4	SXg1-94	0.78
SXg1-81	11.1	SXg1-95	9.78
SXg1-82	13.2	SXg1-96	1.96
SXg1-83	3.59	SXg1-97	8.33
SXg1-84	0.92	SXg1-98	3.44
SXg1-85	0.65		
SXg1-86	0.60		
SXg1-87	Indetectable	$\bar{X}$	5.50
SXg1-88	1.03	$\sigma$	8.95
SXg1-89	9.1		
SXg1-90	0.89		

\* Frecuencia de mutación espontánea a rho<sup>-</sup> de la estirpe SER19= 6.4 x 10<sup>-2</sup>

Tabla 18. - Frecuencia de mutación espontánea a  $\rho^-$  de 48 estirpes  $\rho^+$  haploides procedentes del cigoto nº 2 obtenido de un cruce entre la estirpe inestable SER19\* y la AXp-10 supresiva

Estirpes	Frecuencia de mutación a $\rho^-$ ( $\times 10^{-2}$ )	Estirpes	Frecuencia de mutación a $\rho^-$ ( $\times 10^{-2}$ )
SXg2-1	5.26	SXg2-18	2.73
SXg2-2	Indetectable	SXg2-19	15.7
SXg2-3	1.62	SXg2-20	6.64
SXg2-4	Indetectable	SXg2-21	5.97
SXg2-5	0.61	SXg2-22	Indetectable
SXg2-6	Indetectable	SXg2-23	0.84
SXg2-7	0.85	SXg2-24	11.3
SXg2-8	15.3	SXg2-25	Indetectable
SXg2-9	5.68	SXg2-26	7.47
SXg2-10	2.85	SXg2-27	Indetectable
SXg2-11	1.86	SXg2-28	1.52
SXg2-12	0.48	SXg2-29	Indetectable
SXg2-13	1.88	SXg2-30	Indetectable
SXg2-14	1.53	SXg2-31	Indetectable
SXg2-15	15.5	SXg2-32	0.46
SXg2-16	0.81	SXg2-33	1.2
SXg2-17	2.01	SXg2-34	Indetectable
			.. / ...

Tabla 18. - ( continuación )

Estirpes	Frecuencia de mutación a $\rho^-$ ( $\times 10^{-2}$ )	Estirpes	Frecuencia de mutación a $\rho^-$ ( $\times 10^{-2}$ )
SXg2-35	Indetectable	SXg2-42	Indetectable
SXg2-36	1.16	SXg2-43	7.01
SXg2-37	1.78	SXg2-44	5.55
SXg2-38	17.3	SXg2-45	Indetectable
SXg2-39	Indetectable	SXg2-46	Indetectable
SXg2-40	0.24	SXg2-47	7.5
SXg2-41	2.39	SXg2-48	6.57
		$\bar{X}$	$3.32 \pm 0.67$
		$\sigma$	4.65

\* Frecuencia de mutación espontánea a  $\rho^-$  de la estirpe SER19=  $6.4 \times 10^{-2}$ .

Tabla 19. - Frecuencia de mutación espontánea a  $\rho^-$  de 44 estirpes  $\rho^+$  haploides procedentes del cigoto nº 3, obtenido de un cruce entre la estirpe inestable  $SER19^*$  y la AXp-10 supresiva.

Estirpes	Frecuencia de mutación a $\rho^-$ ( $\times 10^{-2}$ )	Estirpes	Frecuencia de mutación a $\rho^-$ ( $\times 10^{-2}$ )
SXg3-1	9.75	SXg3-16	1.74
SXg3-2	3.46	SXg3-17	0.94
SXg3-3	0.4	SXg3-18	Indetectable
SXg3-4	0.4	SXg3-19	1.93
SXg3-5	0.20	SXg3-20	31.7
SXg3-6	2.46	SXg3-21	3.11
SXg3-7	0.19	SXg3-22	13.5
SXg3-8	2.52	SXg3-23	1.87
SXg3-9	Indetectable	SXg3-24	1.6
SXg3-10	17.2	SXg3-25	0.44
SXg3-11	1.94	SXg3-26	28.7
SXg3-12	1.13	SXg3-27	0.19
SXg3-13	9.45	SXg3-28	1.94
SXg3-14	0.36	SXg3-29	0.4
SXg3-15	1.19	SXg3-30	0.73

.../...

Tabla 19. - ( continuación )

Estirpes	Frecuencia de mutación a $\rho^-$ ( $\times 10^{-2}$ )	Estirpes	Frecuencia de mutación a $\rho^-$ ( $\times 10^{-2}$ )
SXg3-31	1.18	SXg3-38	0.83
SXg3-32	1.74	SXg3-39	1.6
SXg3-33	0.64	SXg3-40	3.24
SXg3-34	1.05	SXg3-41	Indetectable
SXg3-35	0.55	SXg3-42	0.64
SXg3-36	6.62	SXg3-43	0.6
SXg3-37	8.39	SXg3-44	0.84
		$\bar{x}$	$4.84 \pm 0.81$
		$\sigma$	5.35

\* Frecuencia de mutación espontánea a  $\rho^-$  de la estirpe SER19=  $6.4 \times 10^{-2}$ .

gregación del citado fenotipo en la progenie de cigotos obtenidos en cruces entre una estirpe haploide  $\rho^+$  de la primera generación y la misma estirpe  $\rho^-$  supresiva.

Las estirpes de partida fueron la SER19, a, ade<sub>1</sub>, his<sub>2</sub>  $\rho^+$  con una frecuencia de mutación espontánea a  $\rho^-$  de  $6.4 \times 10^{-2}$  cel/gen y la estirpe AXp-10  $\rho^-$   $\alpha$ , tri<sub>1</sub>, his<sub>3</sub> con un porcentaje de supresividad sobre la primera del 63.8%.

El cruce se realizó en medio líquido sin aireación. Se seleccionaron tres cigotos prototrófos  $\rho^+$  en medio mínimo ML y se designaron con los números 1, 2 y 3; los cultivos obtenidos a partir de los mismos se hicieron esporular durante 7 ó 8 días en el medio de Rousseau y Halvorson, manteniéndolos a 28°C y en agitación.

Tras obtener las suspensiones de ascosporas correspondientes, éstas se diseminaron en medio NL, que solo permite la aparición de colonias  $\rho^+$ . Dado que las suspensiones de ascosporas contienen células diploides (aquellas que no habían esporulado) hubo necesidad de determinar el carácter haploide de las células formadoras de las colonias antes citadas, lo que se llevó a cabo efectuando una siembra de ellas en medio mínimo. Se consideraron como haploides las estirpes que no crecieron en el citado medio; con este criterio se eliminan como es lógico, del estudio subsiguiente, las estirpes haploides prototrofas que pudieron haber surgido de la segregación meiótica, pero teniendo en

cuenta que la otra alternativa para determinar la haploidía es la comprobación de la incapacidad de las estirpes para esporular, lo que aumentaría enormemente el trabajo, se prefirió seguir la técnica y criterio señalados.

De esta forma se aislaron:

- a. - 98 estirpes auxótrofas para uno o más marcadores, procedentes del cigoto nº 1, enumeradas como SXg1-1 a SXg1-98.
- b. - 47 estirpes auxótrofas para uno o más marcadores, procedentes del cigoto nº 2, designadas como SXg2-1 a SXg2-47.
- c. - 44 estirpes auxótrofas para uno o más marcadores, procedentes del cigoto nº 3, designadas como SXg3-3.1 a SXg3.44.

A toda la primera generación filial,  $F_1$ , obtenida, se le midió la frecuencia de mutación espontánea a  $\rho^-$  mediante la técnica de Ogur et al (1959) descrita en el apartado (7) del capítulo anterior. Los resultados obtenidos se exponen en las tablas 17, 18 y 19.

De otra parte se ha hecho también la representación gráfica de la distribución de frecuencias de mutación obtenidas para la progenie de cada cigoto, mediante histogramas, en los cuales se expresa en abscisas la frecuencia de mutación espontánea a  $\rho^-$  tomada en intervalos de una unidad, y en ordenadas el porcentaje de estirpes comprendido en cada intervalo o dicho de otra forma, que pertenece a cada intervalo. La parte rayada de cada histograma corresponde al porcentaje de estirpes cuya



frecuencia de mutación espontánea a  $\rho^-$  es menor que la de la estirpe parental SER19, que es del orden de  $6.4 \times 10^{-2}$ /cel/gen.

Los histogramas están representados en las figuras 1, 2 y 3.

Como puede observarse en las tablas e histogramas anteriores, mostraron una frecuencia de mutación espontánea a  $\rho^-$  menor que la estirpe madre SER19, el 75.5% de las estirpes obtenidas del cigoto número 1, el 79.2% de las del número 2 y el 81.8% de las del número 3. Considerada globalmente la progenie de los tres cigotos, el porcentaje de estirpes haploides con la característica antes indicada fué del 77%.

La segunda parte de la experiencia consistió, como ya se ha indicado, en volver a estudiar la segregación del carácter "estable" en la progenie haploide obtenida de un cigoto  $\rho^+$  procedente de un cruce entre una de las estirpes  $\rho^+$  estabilizadas obtenida en la experiencia anterior -la designada como SXg1-31- y la misma estirpe supresiva, AXp-10, empleada anteriormente.

Se siguió exactamente la misma técnica anteriormente descrita, seleccionandose 99 estirpes  $\rho^+$  haploides que se designaron como S2Xg1-1 hasta S2Xg1-99.

La frecuencia de mutación espontánea a  $\rho^-$  de las citadas estirpes y la distribución de la misma se exponen, res-



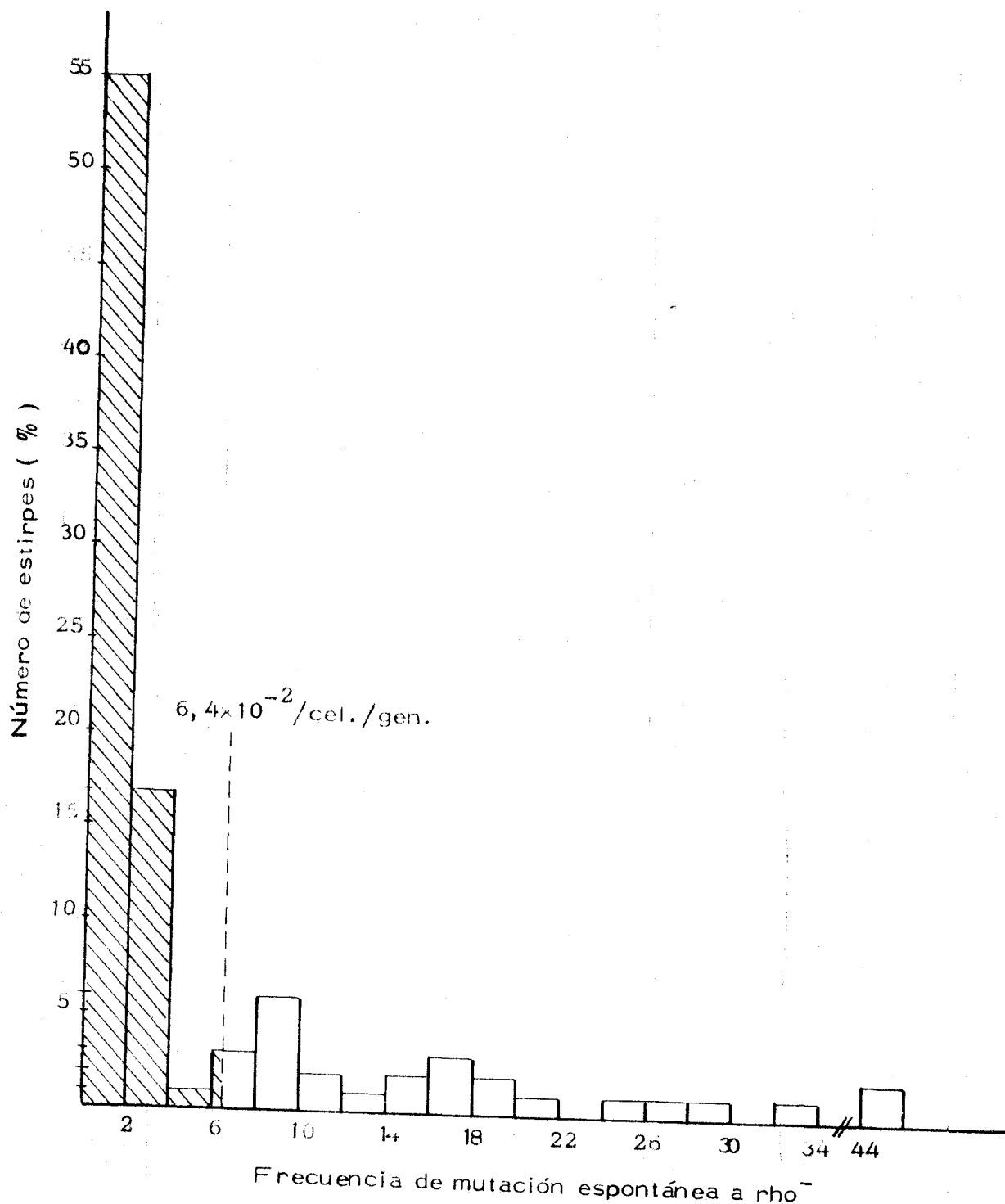


Figura nº 1. -

Distribución de la frecuencia de mutación espontánea a rho<sup>-</sup> de 98 estirpes haploides procedentes del cigoto nº 1. La parte rayada corresponde al 75,5% de las estirpes probadas, las cuales presentan una frecuencia de mutación a rho<sup>-</sup> menor que la estirpe parental SER19.

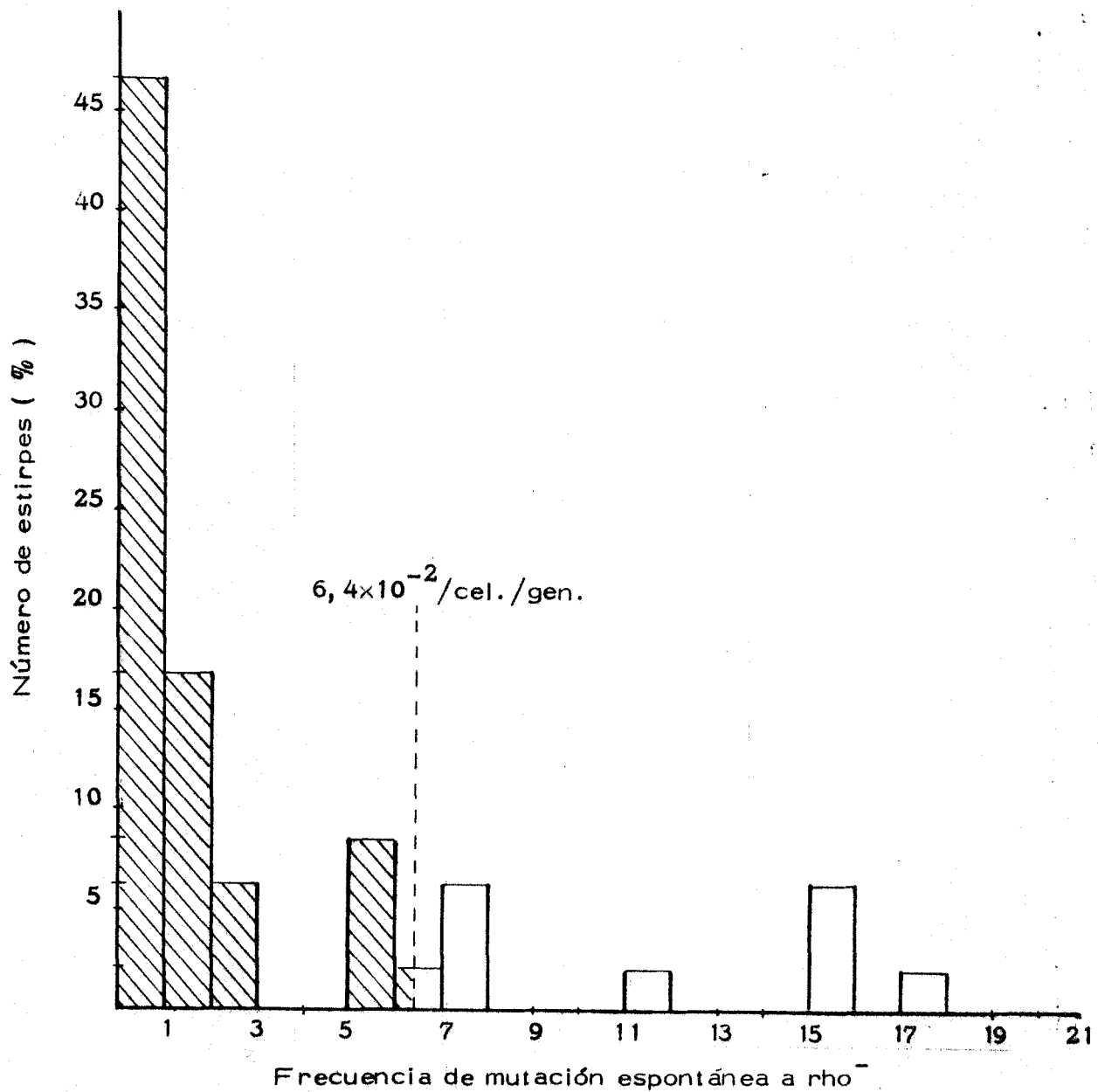


Figura nº 2. -

Distribución de la frecuencia de mutación espontánea a  $\rho^-$  de 47 estirpes haploides procedentes del cigoto nº 2. La parte rayada corresponde al 79,2% de las estirpes probadas, las cuales presentan una frecuencia de mutación a  $\rho^-$  menor que la estirpe parental SER19.

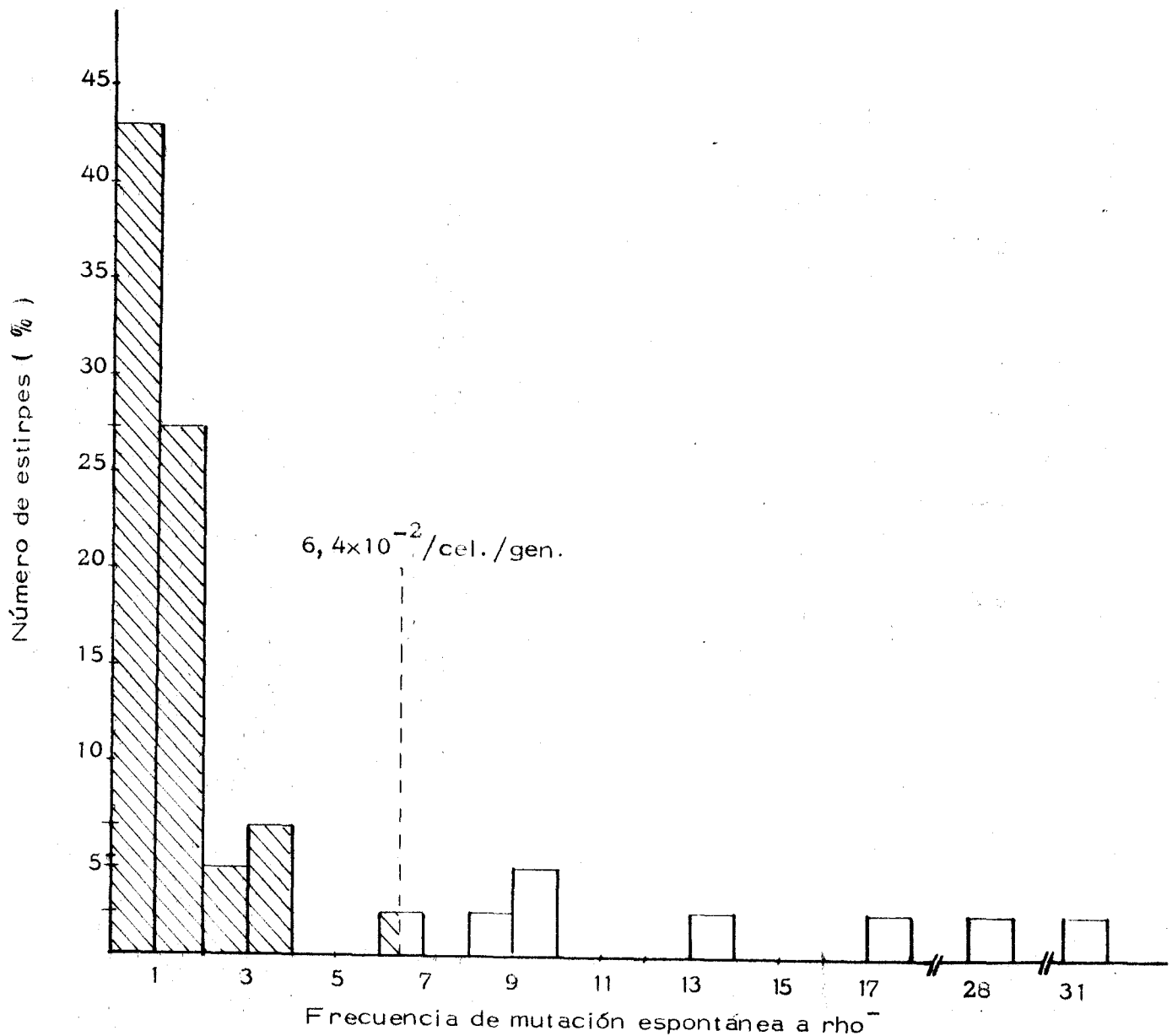


Figura nº 3. -

Distribución de la frecuencia de mutación espontánea a rho<sup>-</sup> de 44 estirpes haploides procedentes del cigoto nº 3. La parte rayada corresponde al 81,8% de las estirpes probadas, las cuales presentan una frecuencia de mutación a rho<sup>-</sup> menor que la estirpe parental SER19.

pectivamente, en la tabla nº 20 y en la figura 4. Como puede observarse el 88.4% de las estirpes ensayadas mostraron una frecuencia de mutación inferior a la de la estirpe madre SXg1-31 y el 100% inferior a la de la estirpe de partida SER19.

Los resultados obtenidos como se discutirá en el capítulo siguiente, demuestran que nos encontramos ante un caso de herencia citoplasmática y que, por tanto, los determinantes genéticos que condicionan la estabilidad y la resistencia a la supresión son de naturaleza citoplasmática: el propio ADNm estable.

Tabla 20. - Frecuencia de mutación espontánea a  $\rho^-$  de 99 estirpes  $\rho^+$  haploides, procedentes de un cigoto obtenido del cruce SXg1-31\* por AXp-10

Estirpes	Frecuencia de mutación a $\rho^-$ ( $\times 10^{-2}$ )	Estirpes	Frecuencia de mutación a $\rho^-$ ( $\times 10^{-2}$ )
S2Xg1-1	Indetectable	S2Xg1-10	0.41
S2Xg1-2	1.06	S2Xg1-11	0.46
S2Xg1-3	0.3	S2Xg1-12	Indetectable
S2Xg1-4	Indetectable	S2Xg1-13	0.23
S2Xg1-5	0.28	S2Xg1-14	0.56
S2Xg1-6	0.63	S2Xg1-15	Indetectable
S2Xg1-7	0.24	S2Xg1-16	Indetectable
S2Xg1-8	0.71	S2Xg1-17	0.53
S2Xg1-9	0.63	S2Xg1-18	0.36

.../...

Tabla 20. - (continuación)

Estirpes	Frecuencia de mutación a $\rho^-$ ( $\times 10^{-2}$ )	Estirpes	Frecuencia de mutación a $\rho^-$ ( $\times 10^{-2}$ )
S2Xg1-19	0.54	S2Xg1-40	2.2
S2Xg1-20	0.28	S2Xg1-41	1.04
S2Xg1-21	0.20	S2Xg1-42	0.3
S2Xg1-22	1.89	S2Xg1-43	0.34
S2Xg1-23	1.02	S2Xg1-44	0.49
S2Xg1-24	1.48	S2Xg1-45	0.33
S2Xg1-25	0.26	S2Xg1-46	0.79
S2Xg1-26	0.33	S2Xg1-47	0.78
S2Xg1-27	Indetectable	S2Xg1-48	0.3
S2Xg1-28	0.44	S2Xg1-49	0.16
S2Xg1-29	0.75	S2Xg1-50	1
S2Xg1-30	Indetectable	S2Xg1-51	0.33
S2Xg1-31	Indetectable	S2Xg1-52	0.25
S2Xg1-32	Indetectable	S2Xg1-53	0.3
S2Xg1-33	0.41	S2Xg1-54	0.64
S2Xg1-34	Indetectable	S2Xg1-55	1.04
S2Xg1-35	1.47	S2Xg1-56	0.28
S2Xg1-36	1.47	S2Xg1-57	0.34
S2Xg1-37	0.54	S2Xg1-58	0.53
S2Xg1-38	0.46	S2Xg1-59	0.56
S2Xg1-39	0.72	S2Xg1-60	0.34

.../...

Tabla 20. - (continuación)

Estirpes	Frecuencia de mutación a $\rho^-$ ( $\times 10^{-2}$ )	Estirpes	Frecuencia de mutación a $\rho^-$ ( $\times 10^{-2}$ )
S2Xg1-61	1.99	S2Xg1-83	0.20
S2Xg1-62	1.27	S2Xg1-84	0.21
S2Xg1-63	2.76	S2Xg1-85	0.59
S2Xg1-64	3.66	S2Xg1-86	0.48
S2Xg1-65	0.51	S2Xg1-87	0.22
S2Xg1-66	0.07	S2Xg1-88	0.42
S2Xg1-67	0.2	S2Xg1-89	0.29
S2Xg1-68	0.3	S2Xg1-90	0.49
S2Xg1-69	1.56	S2Xg1-91	0.70
S2Xg1-70	0.84	S2Xg1-92	0.16
S2Xg1-71	0.71	S2Xg1-93	0.22
S2Xg1-72	0.94	S2Xg1-94	0.49
S2Xg1-73	0.52	S2Xg1-95	0.14
S2Xg1-74	0.65	S2Xg1-96	0.24
S2Xg1-75	1.79	S2Xg1-97	Indetectable
S2Xg1-76	0.15	S2Xg1-98	0.39
S2Xg1-77	0.67	S2Xg1-99	Indetectable
S2Xg1-78	1.38		
S2Xg1-79	0.61	X	0.58
S2Xg1-80	0.54	$\sigma$	0.60
S2Xg1-81	0.48		
S2Xg1-82	0.43		

\* Frecuencia de mutación espontánea a  $\rho^-$  de la estirpe SXg1-31:  
 $1.28 \times 10^{-2}$

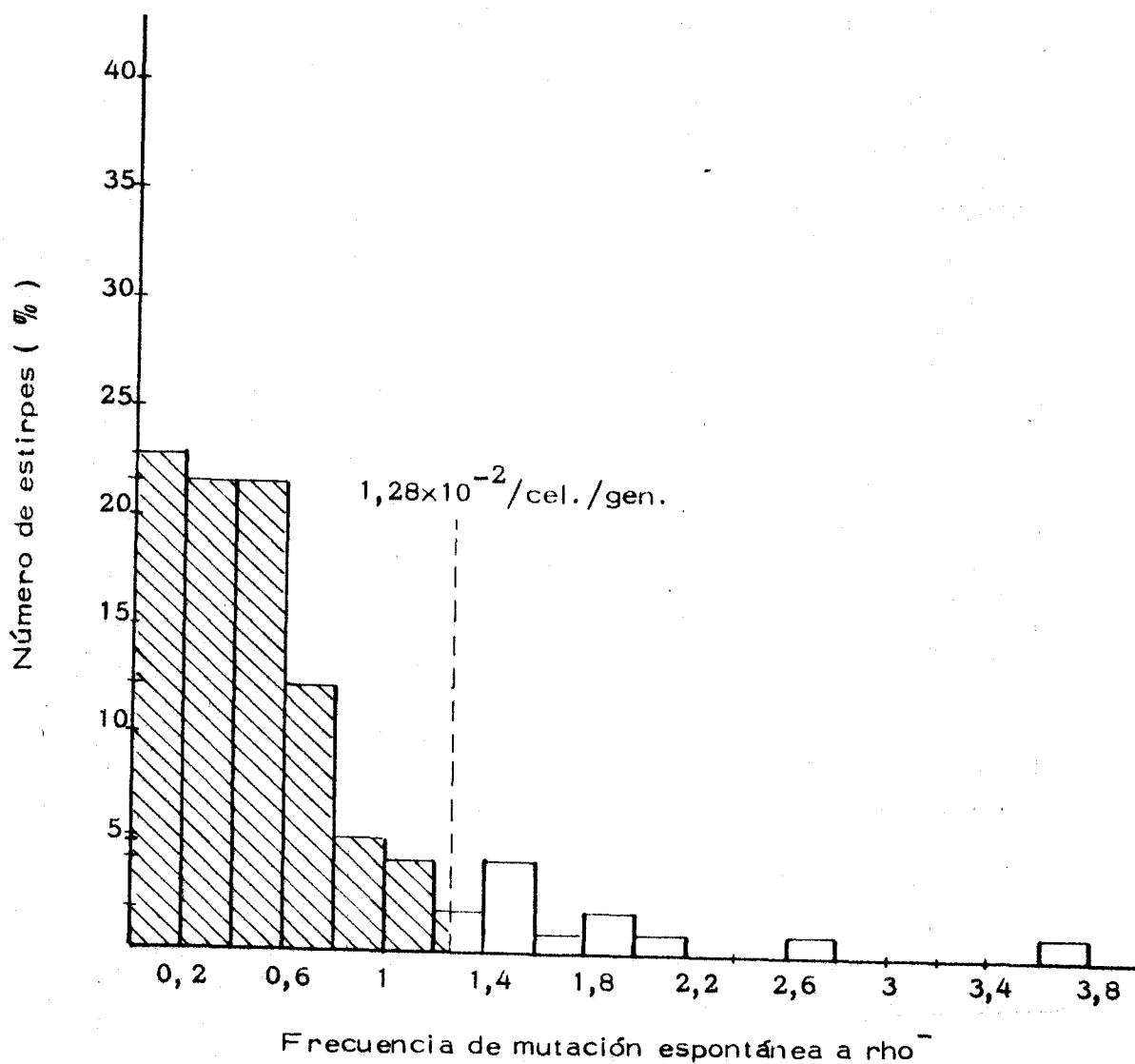


Figura nº 4. -

Distribución de la frecuencia de mutación espontánea a rho<sup>-</sup> de 99 estirpes haploides procedentes de un cigoto obtenido del cruce SXg1-31 por AXp-10. La parte rayada corresponde al 88,4% de las estirpes ensayadas las cuales presentan una frecuencia de mutación a rho<sup>-</sup> menor que la estirpe parental SXg1-31.

#### 4. INFLUENCIA DEL GENOMIO MITOCONDRIAL DE LOS MUTANTES $\rho^-$ SOBRE LA ESTABILIDAD RESPIRATORIA DE LA PROGENIE HAPLOIDE DE ZIGOTOS OBTENIDOS EN CRUCES CON $\rho^+$ INESTABLES

Hasta el momento se ha demostrado que la estabilidad respiratoria y paralelamente la resistencia a la supresividad viene condicionada por determinantes citoplasmáticos que se identifican con el factor  $\rho$  o ADN mitocondrial. Ahora bien, en el transcurso de las experiencias no ha sido tomada en cuenta la posible influencia que sobre la estabilidad respiratoria de la progenie haploide de zigotos procedentes de cruces  $\rho^+$  y  $\rho^-$  pudiera jugar el ADNm de la estirpe  $\rho^-$  empleada en el cruce, ya que siempre se han empleado estirpes supresivas obtenidas a partir de otras  $\rho^+$  estables. Pudiera suceder por tanto que la estabilización de una estirpe  $\rho^+$  inestable no dependiese del carácter supresivo de la estirpe  $\rho^-$ , sino que estuviese condicionada por la presencia o no en el genomio mitocondrial de las estirpes  $\rho^-$  supresivas, de un determinante de la estabilidad que al transmitirse a los genomios mitocondriales  $\rho^+$  presentes en los zigotos, mediante un proceso de recombinación, transmitiese a los mismos el carácter estable.

Para comprobar o descartar esta posibilidad se plan-



tearon una serie de cruces en los que se analizó la estabilidad respiratoria de la progenie haploide de zigotos  $\rho^+$  obtenidos en cruces con estirpes  $\rho^-$  de los siguientes tipos:

- a. - Supresivas, obtenidas de estirpes  $\rho^+$  estables (S + E)
- b. - Supresivas obtenidas de estirpes  $\rho^+$  inestables (S + I)
- c. - No supresivas, obtenidas de estirpes  $\rho^+$  estables (NS + E)
- d. - No supresivas, obtenidas de estirpes  $\rho^+$  inestables (NS + I)

Las experiencias se llevaron a cabo de la forma acostumbrada obteniendo los zigotos  $\rho^+$  respectivos y analizando la frecuencia de mutación a  $\rho^-$  de las estirpes haploides obtenidas por esporulación de los mismos mediante la técnica de Ogur et al. (1959).

En dos casos se llevó a cabo además el mismo tipo de experiencias pero mediante el empleo de las técnicas de micromanipulación descritas en el capítulo anterior, analizándose en estos casos la estabilidad respiratoria de 24 ascosporas obtenidas por disección de 6 ascas.

Los datos técnicos de cada experiencia se exponen a continuación y los resultados, excluidos los obtenidos por micromanipulación, se resumen en la tabla 21, en la que se incluyen el número de estirpes haploides analizadas y el porcentaje de las mismas que mostró una frecuencia de mutación igual o inferior a la de la estirpe  $\rho^+$  parental.

Estos resultados complementados con los obtenidos en la experiencia de micromanipulación (Tablas 22 y 23), indican, como se discutirán oportunamente, que el ADN<sub>m</sub> de las células  $\rho^-$ , independientemente del carácter supresivo o no de las mismas, es capaz de transferir o conferir la estabilidad respiratoria.

4.1. Cruce de una estirpe  $\rho^+$  inestable con una  $\rho^-$  supresiva derivada de una estirpe  $\rho^+$  estable (S + E)

-- Estirpe  $\rho^+$ : SER19 a, ade<sub>1</sub>, his<sub>2</sub> con una frecuencia de mutación espontánea de  $6.4 \times 10^{-2}$ .

-- Estirpe  $\rho^-$ : Xp-10 a, tri<sub>1</sub>, his<sub>3</sub> con un 63.8% de supresividad frente a la anterior y obtenida de la estirpe  $\rho^+$  X-3 con una frecuencia de mutación espontánea de  $1 \times 10^{-2}$ .

4.2. Cruce de una estirpe  $\rho^+$  inestable con una  $\rho^-$  no supresiva derivada de una estirpe  $\rho^+$  estable (NS + E)

-- Estirpe  $\rho^+$ : Sb-2 a, ade<sub>1</sub>, his<sub>2</sub> con una frecuencia de mutación espontánea de  $5.2 \times 10^{-2}$ .

-- Estirpe  $\rho^-$ : Xp-9 a, tri<sub>1</sub>, his<sub>3</sub> con un 0.4% de supresividad frente a la anterior y obtenida como mutante espontánea de la estirpe X-3 cuya frecuencia de mutación es de  $1 \times 10^{-2}$ .

4.3. Cruce de una estirpe  $\rho^+$  inestable con una  $\rho^-$  supresiva derivada de una estirpe  $\rho^+$  inestable (S + I)

-- Estirpe  $\rho^+$ : SbXg 1-8 a, ade<sub>1</sub>, lis<sub>2</sub> con una frecuencia de mutación espontánea de  $6.1 \times 10^{-2}$

-- Estirpe  $\rho^-$ : SbXmp 1.69 a, tri<sub>1</sub>, his<sub>3</sub> con un 15.8% de supresividad, procedente de la estirpe SbXg 1-69 cuya frecuencia de mutación es de  $14.34 \times 10^{-2}$ .

4.4. Cruce de una estirpe  $\rho^+$  inestable con una  $\rho^-$  no supresiva obtenida a partir de una estirpe  $\rho^+$  inestable (NS + I)

-- Estirpe  $\rho^+$ : SbXg 1-8 a, ade<sub>1</sub>, lis<sub>2</sub> con una frecuencia de mutación de  $6.1 \times 10^{-2}$ .

-- Estirpe  $\rho^-$ : SbXg 1-69 a, tri<sub>1</sub>, his<sub>3</sub> con 1.2% de supresividad, procedente de la estirpe SbXg-69 con una frecuencia de mutación espontánea de  $14.3 \times 10^{-2}$ .

4.5. Estirpes haploides obtenidas mediante técnicas de micromanipulación.

4.5.1. Cruce de una estirpe  $\rho^+$  inestable con una  $\rho^-$  supresiva derivada de una estirpe  $\rho^+$  estable (S + E)

-- Estirpe  $\rho^+$ : Sb-2 a, ade<sub>1</sub>, lis<sub>2</sub> con una frecuencia de mutación espontánea de  $5.2 \times 10^{-2}$ .

- Estirpe  $\rho^-$ : AXp-10 a, tr<sub>1</sub>, his<sub>3</sub> con un 53.4% de supresividad frente a la anterior y obtenida de la estirpe X-3 con una frecuencia de mutación de  $1 \times 10^{-2}$
- Nº de ascas disecadas: 6

Los resultados obtenidos se exponen en la tabla 22.

4.5.2. Cruce de una estirpe  $\rho^+$  inestable con una  $\rho^-$  no supresiva derivada de una estirpe  $\rho^+$  estable (NS + E)

- Estirpe  $\rho^+$ : SER19 a, ade<sub>1</sub>, his<sub>2</sub> con una frecuencia de mutación espontánea de  $6.4 \times 10^{-2}$ .

- Estirpe  $\rho^-$ : Xp-9 a, tr<sub>1</sub>, his<sub>3</sub> con un 0.14% de supresividad frente a la anterior obtenida como mutante espontánea de la estirpe X-3 cuya frecuencia de mutación es de  $1 \times 10^{-2}$ .

Nº de ascas disecadas: 6

Tabla 21.- Porcentaje de estirpes  $\rho^+$  haploides con una frecuencia de mutación a  $\rho^-$  igual o inferior a la de las estirpes  $\rho^+$  parentales procedentes de zigotos obtenidos en cruces entre las anteriores y diversos tipos de estirpes  $\rho^-$

Estirpes $\rho^+$	Cruces Estirpes $\rho^-$	Nº de estirpes haploides analizadas	% de estirpes con frecuencia de mutación igual o inferior a la de la estirpe $\rho^+$ parental
I	(S + E)	146	77.24
I	(NS + E)	35	82.85
I	(S + I)	47	61.7
I	(NS + I)	53	26.41

I : inestable

(S + E): supresiva, derivada de una estirpe  $\rho^+$  estable

(S + I) : supresiva, derivada de una estirpe  $\rho^+$  inestable

(NS + E): no supresiva, derivada de una estirpe  $\rho^+$  estable

(NS + I): no supresiva, derivada de una estirpe  $\rho^+$  inestable

Tabla 22. - Frecuencia de mutación a  $\rho^-$  de las estirpes aisladas por disección de ascas obtenidas en cruces entre una estirpe  $\rho^+$  inestable y otra  $\rho^-$  supresiva, derivada de una  $\rho^+$  estable.

Ascas	Estirpes	Frecuencia			
		mutación - ( $\times 10^{-2}$ )	mutación ( $\times 10^{-2}$ )		
I	1	0.2	IV	1	0.29
	2	1.4		2	3.8
	3	1.62		3	1.84
	4	2.1		4	4.12
II	1	-	V	1	2.22
	2	1.96		2	1.42
	3	2.53		3	0.35
	4	0		4	0.94
III	1	1.6	VI	1	0.6
	2	0.66		2	6.95
	3	0		3	4.96
	4	2.8		4	0.77

% de estirpes con una frecuencia de mutación igual o inferior a la de la estirpe  $\rho^+$  parental: 87.5

Tabla 23. - Frecuencia de mutación a  $\rho^-$  de las estirpes aisladas por disección de ascas obtenidas en cruces entre una estirpe  $\rho^+$  inestable y otra  $\rho^-$  no supresiva, derivada de una  $\rho^+$  estable.

Ascas	Estirpes	Frecuencia mutación ( $\times 10^{-2}$ )	Ascas	Estirpes	Frecuencia mutación ( $\times 10^{-2}$ )
I	1	1.41	IV	1	3.5
	2	1.36		2	0.54
	3	1		3	0
	4	0.46		4	12
II	1	7.66	V	1	2.32
	2	0.79		2	10.59
	3	1.57		3	0
	4	7.01		4	0.35
III	1	9.21	VI	1	4.64
	2	0		2	9.54
	3	10.81		3	10.7
	4	3.32		4	0.5

% de estirpes con una frecuencia de mutación igual o inferior a la de la estirpe  $\rho^+$  parental: 70.8

## 5. INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES AMBIENTALES SOBRE LA ESTABILIDAD Y RESISTENCIA A LA SUPRESIVIDAD DE ESTIRPES $\rho^+$

Como colofón a los estudios sobre los determinantes genéticos que condicionan la estabilidad respiratoria de las estirpes  $\rho^+$  de S. cerevisiae se ha considerado conveniente efectuar un estudio de la influencia que las condiciones ambientales ejercen sobre la expresión de los citados determinantes genéticos y en consecuencia sobre la resistencia a la supresividad de las estirpes  $\rho^+$  frente a las  $\rho^-$ .

En este sentido se ha considerado interesante examinar la estabilidad respiratoria de estirpes  $\rho^+$  a lo largo de su ciclo de crecimiento en un medio óptimo para levaduras, en condiciones de oxigenación distintas, en medio con pH iniciales diferentes, con fuentes de carbono utilizables por fermentación o solo por vía oxidativa, y finalmente en función de la cantidad de inóculo empleado.

Dado que la determinación de las tasas de mutación a  $\rho^-$  solo es posible llevarla a cabo en condiciones fijas, incompatibles a veces con las variaciones ambientales a examinar, se ha escogido como índice de la estabilidad respiratoria el porcen\_



taje de células  $\rho^-$  presentes en los cultivos en el momento de la determinación.

En la mayoría de los casos se han empleado para la realización de las experiencias una estirpe estable y otra inestable.

5. 1. Variación del porcentaje de células  $\rho^-$  en cultivos de estirpes  $\rho^+$  y de su resistencia a la supresividad, según la etapa de su ciclo de crecimiento

En estas experiencias se emplearon las estirpes  $\rho^+$  SER19, SXg4-37 y SXg4-125, ya descritas anteriormente; la primera inestable, la segunda altamente estable y la tercera ligeramente inestable (16.7%, 0.67% y 4.7%, respectivamente, de células  $\rho^-$  en cultivos en fase estacionaria en medio NG). La resistencia a la supresividad se determinó frente a las estirpes AXp-10 y Xp-4.

Previamente a la realización de estas experiencias se determinó la gráfica patrón del crecimiento de las estirpes  $\rho^+$  y  $\rho^-$ , en medio NG, a 28° y en agitación, según la técnica descrita en el capítulo anterior.

Las gráficas obtenidas mostraron que en estas condiciones las estirpes  $\rho^+$  inician la fases de crecimiento logarítmico aproximadamente a las 3 horas de incubación, fase que se mantiene durante 7 horas más hasta comenzar la etapa de transición-

hacia la fase de crecimiento estacionario. De acuerdo con estos datos, para la realización de las experiencias proyectadas, las muestras de levaduras  $\rho^+$  en las que se determinó el porcentaje de células  $\rho^-$ , así como la resistencia a la supresividad frente a las estirpes AXp-10 y Xp-4 se tomaron a las 3, 7, 10 y 48 horas de incubación de los cultivos: comienzo, mitad y final de la fase logarítmica y fase estacionaria. En todos los casos las muestras fueron centrifugadas, lavadas y resuspendidas en solución salina, dejándolas en reposo durante una noche al objeto de que las yemas completaran su proceso de formación y separaran de las células madres. Transcurrido este tiempo, se determinó el porcentaje de células  $\rho^-$  presente en las muestras y se determinó mediante la técnica usual la resistencia a la supresividad frente a las estirpes  $\rho^-$  indicadas.

Los resultados se expresan en la tabla 24, e indican que ni el porcentaje de células  $\rho^-$  ni la resistencia a la supresividad varían notablemente a lo largo del ciclo de crecimiento, aunque hacia el final de la etapa de crecimiento logarítmico puede apreciarse un ligero aumento en el porcentaje de células  $\rho^-$  y en algunos casos una disminución en la resistencia a la supresividad.

Una repetición de la experiencia anterior en la que tanto los recuentos de células  $\rho^-$  como las determinaciones de supresividad se realizaron inmediatamente después de tomadas las muestras, si bien con alguna diferencia en las cifras absolutas, arrojó el mismo tipo de datos mostrados.

Tabla 24. - Porcentaje de células rho<sup>-</sup> en cultivos de estirpes rho<sup>+</sup> y resistencia a la supresividad de éstas frente a estirpes rho<sup>-</sup>, según las distintas fases de su ciclo de crecimiento.

Estirpes rho <sup>+</sup>	Fase crecimiento	Células rho <sup>-</sup> %	% RS frente a las estirpes:	
			AXp-10	Xp-4
SER19	1	16.10	61.3	70.90
	2	17.10	48.7	72.6
	3	20.90	45.9	73.1
	4	17.4	48.6	72.1
SXg4-27	1	0.48	90.4	90.82
	2	0.67	90.4	90.8
	3	0.79	89.2	91.9
	4	0.67	91.4	95.8
SXg4-125	1	4.54	96.2	82.6
	2	4.72	96	82.6
	3	4.90	97.5	78.72
	4	4.70	96	82.6

1: comienzo fase logarítmica; 2 fase logarítmica; 3: final fase logarítmica; 4: fase estacionaria.

## 5.2. Variación del porcentaje de células rho<sup>-</sup> en cultivos de estirpes rho<sup>+</sup> y de su resistencia a la supresividad según la modalidad de cultivo

Normalmente, todas las experiencias realizadas lo fueron utilizando cultivos incubados a 28° y sometidos a una agitación constante en un agitador orbital a 140 rpm por lo que se ha querido comprobar si una aireación más intensa afecta tanto al porcentaje de células rho<sup>-</sup> como a la resistencia a la supresividad de los cultivos.

Para ello se ha realizado una experiencia en que la aireación de los cultivos se llevó a cabo haciendo burbujear aire estéril a través del medio de cultivo dispuesto en tubos de 20 x 200 mm, con un flujo de 30 litros/minuto/litro de medio. Como estirpes rho<sup>+</sup> inestables se empleó la Sbg8 y como estable la X-3. La resistencia a la supresividad se midió frente a la estirpe AXp-10 en el primer caso y frente a la Sp-5 en el segundo.

Los resultados obtenidos en estas condiciones fueron de 31.3% de células rho<sup>-</sup> para la Sbg8 y de 1.99% para la X-3, que no difieren prácticamente de los obtenidos previamente en cultivos en agitación (32.8% y 1.5% respectivamente).

En cuanto a la resistencia a la supresividad, los datos obtenidos fueron idénticos a los mostrados en los apartados 1.5.2. y 1.5.1 de este capítulo.

5.3. Variación del porcentaje de células rho<sup>-</sup> en cultivos de es-  
tirpes rho<sup>+</sup> y de su resistencia a la supresividad en función  
del pH inicial del medio de cultivo

Se llevó a cabo este estudio empleando medio NG a los pHs de 3 ;4; 4.5; 5 y 6. Como estirpe inestable se empleó la Sbg. 8 y como estirpe estable la X-3. Los cultivos se llevaron a cabo en la forma acostumbrada, determinandose en cada uno el porcentaje de células rho<sup>-</sup> en la fase estacionaria y la resistencia a la supresividad frente a las estirpes AXp-10 y Sp-17, respectivamente. Esta última determinación solo se efectuó en los cultivos a pH 3, 4.5 y 6.

Los resultados obtenidos se exponen en la tabla 25 e indican que a pH próximo a la neutralidad aumenta el porcentaje de células rho<sup>-</sup> ligeramente mientras que un pH por bajo del óptimo ejerce un efecto contrario. La resistencia a la supresividad no es prácticamente afectada.

5.4. Variación del porcentaje de células rho<sup>-</sup> en cultivos de es-  
tirpes rho<sup>+</sup> y de su resistencia a la supresividad en función  
de la naturaleza de las fuentes de carbono presentes en el me-  
dio

Una de las características de los mutantes rho<sup>-</sup>, tal

Tabla 25. - Influencia del pH inicial del medio de cultivo sobre el porcentaje de células rho<sup>-</sup> en cultivos de estirpes rho<sup>+</sup> y en la resistencia a la supresividad de las mismas - frente a estirpes rho<sup>-</sup>.

Estirpe	pH	cel. rho <sup>-</sup> %	% RS frente a AXp-10
Sbg-8	3	21.63	54.6
Sbg-8	4	26.5	-
Sbg-8	4.5	32.6	54
Sbg-8	5	37.12	-
Sbg-8	6	40.7	53
X-3	3	0.96	97.5
X-3	4	1.21	-
X-3	4.5	1.49	96.4
X-3	5	2.15	-
X-3	6	2.6	94.6

como quedó expuesto en la introducción, es su incapacidad para utilizar como fuente de carbono sustratos que no pueden ser degradados por vía fermentativa tales como el lactado, glicerina, etc. y por tanto su no desarrollo en medios en los que la única fuente de carbono sea uno de tales compuestos. Es pues obvio que cuando una estirpe  $\rho^+$  ya sea estable o inestable se hace crecer en un medio con lactato como única fuente de carbono el porcentaje de células  $\rho^-$  en cultivos en fase estacionaria será sensiblemente menor que si se cultiva en un medio con glucosa, ya que en el primer caso sólo aparecerán las células  $\rho^-$  surgidas por mutación, mientras que en el segundo el número se verá incrementado por la descendencia de las mismas. Aún cuando esta estabilización respiratoria fenotípica esta perfectamente demostrada, se ha querido comprobar el grado que alcanza la misma en estirpes  $\rho^+$  estables e inestables y el efecto que tiene sobre su resistencia a la supresividad.

Como estirpes  $\rho^+$  estables se han empleado las X-3, Xg-5, SXg4-27 y SXg4-125 y como inestables las SER19 y Sb-2. La resistencia a la supresividad se comprobó en el caso de las estirpes pertenecientes a la serie X frente a la estirpe Sp-17 y en el caso de las de la serie S frente a la estirpe AXp-10. Tanto el recuento de células  $\rho^-$  como la determinación de la resistencia a la supresividad se realizó, por las técnicas descritas, en cultivos de 48 horas sobre medio NG o NL. Los resultados obtenidos se exponen en la tabla 26 y a más de la estabilización fe

notífica esperada demuestran que la resistencia a la supresividad de las estirpes rho<sup>+</sup> es notablemente superior cuando se han cultivado en medios con lactato como única fuente de carbono.

Tabla 26. - Porcentaje de células rho<sup>-</sup> en cultivos en fase estacionaria de estirpes rho<sup>+</sup> y resistencia de las mismas a la supresividad de estirpes rho<sup>-</sup>, en medios con glucosa o lactato como únicas fuentes de carbono.

Estirpes rho <sup>+</sup>	Células rho <sup>-</sup> (%)		% Resistencia supresividad *	
	glucosa	lactato	glucosa	lactato
X-3	1.5	0.9	97	100
Xg-5	2.2	0.9	97	99.3
SXg4-27	0.67	0.28	85.1	95.5
SXg4-125	4.7	0.5	87.3	94.7
SER 19	16.1	6.4	48.7	97
Sb-2	16.7	5.6	72.1	89.1

\* Determinada en el caso de las estirpes X-3 y Xg-5 frente a la estirpe Sp-17 y en el de las restantes frente a la AXp-10.



## 6. ESTUDIO COMPARATIVO DE LA HABILIDAD DE CRUCE DE ESTIRPES $\text{rho}^+$ Y $\text{rho}^-$

A lo largo de las experiencias expuestas en esta memoria, se ha podido observar que, aún sin que se pueda formular una correlación de tipo matemático, la resistencia de las estirpes  $\text{rho}^+$  frente a la supresividad de las distintas estirpes  $\text{rho}^-$  ensayadas, va claramente ligada a la mayor o menor proporción de células  $\text{rho}^-$  en sus cultivos, incluso cuando está condicionada no por características genéticas sino por circunstancias ambientales. En el cálculo de la supresividad por la fórmula de Sherman y Ephrussi, hasta aquí empleada, y por consiguiente en el de la resistencia a la misma, se introduce un factor de corrección (Y) que, teóricamente, debería anular las variaciones en el valor de la supresividad debidas a las distintas proporciones de células  $\text{rho}^-$  presentes en los cultivos  $\text{rho}^+$ . El que este factor de corrección no basta resulta evidente, y no basta porque Sherman y Ephrussi parten de la base de que la habilidad de cruce entre las células  $\text{rho}^-$  y  $\text{rho}^+$  de un cultivo de una raza  $\text{rho}^+$  y las  $\text{rho}^-$  supresivas, es idéntica, hecho que trabajos realizados en nuestro laboratorio (González, 1974) han demostrado no ser cierto.

En esta Tesis, y como final del trabajo experimental de la misma, se ha querido profundizar sobre el tema con miras

fundamentalmente a establecer un método para el cálculo de la su presividad en el que se tenga en cuenta no sólo el porcentaje de células  $\rho^-$  presentes en los cultivos  $\rho^+$  sino también la dis- tinta habilidad de cruce entre los distintos tipos de células que in tervienen en la determinación.

En una primera experiencia se llevaron a cabo todos los cruces posibles  $\rho^+$  por  $\rho^+$ ,  $\rho^+$  por  $\rho^-$  y  $\rho^-$  por  $\rho^-$  entre una estirpe  $\rho^+$  y dos  $\rho^-$  derivadas de la Sb-2 (a, ade<sub>1</sub>, lis<sub>2</sub>) y una  $\rho^+$  y dos  $\rho^-$  derivadas de la X-3 (a, tri<sub>1</sub>, his<sub>3</sub>.)

La estirpe  $\rho^+$  de la serie S fue la Sg-5 con un por centaje de mutantes  $\rho^-$  del 3%; como estirpes  $\rho^-$  de la serie S se emplearon la Sp-17 y Sp-18.

La estirpe  $\rho^+$  de la serie X fue la Xg-5 con un por centaje de mutantes  $\rho^-$  del 2.2%; como estirpes  $\rho^-$  de la serie X se emplearon las Xp-6 y Xp-11. Todas las estirpes citadas han sido previamente descritas.

Los cruces se llevaron a cabo de la forma habitual y en cada caso se determinó su "rendimiento en zigotos", entendiendo por tal "el porcentaje de zigotos totales  $\rho^+$  mas  $\rho^-$  forma dos sobre el número máximo teórico de zigotos que deberían formarse en función del número de células a y a que intervienen en cruce".

A efectos comparativos se calculó la "habilidad de cruce (h), que en cada caso representa el cociente entre el ren-

Tabla 27.- Estudio comparativo del rendimiento en zigotos de cruces entre estirpes  $\rho^+$  y  $\rho^-$

Estirpe cruzada <u>a</u> por <u><math>\alpha</math></u>	Tipo de cruce	Rendimiento en zigotos (%) *	Habilidad de cruce (h) **
Sg-5 Xg-5	$\rho^+ \times \rho^+$	0.0037	1
Sg-5 Xp-6	$\rho^+ \times \rho^-$	0.0280	7.56
Sg-5 Xp-11	$\rho^+ \times \rho^-$	0.0430	11.62
Sp-17 Xg-5	$\rho^- \times \rho^+$	0.0120	3.24
Sp-18 Xg-5	$\rho^- \times \rho^+$	0.2400	64.8
Sp-17 Xp-6	$\rho^- \times \rho^-$	0.3900	105.4
Sp-17 Xp-11	$\rho^- \times \rho^-$	0.2300	62.16
Sp-18 Xp-6	$\rho^- \times \rho^-$	0.5600	151.35
Sp-18 Xp-11	$\rho^- \times \rho^-$	0.2600	70.27

\* número de zigotos formados sobre el máximo teórico posible

\*\* calculada tomando como unidad la correspondiente al cruce

$\rho^+ \times \rho^+$

dimiento en zigotos del cruce entre dos estirpes y el correspondiente al cruce  $\rho^+$  por  $\rho^+$  que se tomó como unidad.

Los resultados de esta experiencia se exponen en la tabla 27 y confirman que el rendimiento en zigotos es muy distinto en cruces  $\rho^+$  por  $\rho^+$ ,  $\rho^+$  por  $\rho^-$  y  $\rho^-$  por  $\rho^-$ , hasta el punto de que en este último caso la habilidad de cruce a "grosso modo" es de orden 100 con respecto a la de  $\rho^+$  por  $\rho^+$  y de orden 10 con respecto a la de  $\rho^+$  por  $\rho^-$ .

En una segunda experiencia se trató de ver si la proporción de mutantes  $\rho^-$  presentes en los cultivos  $\rho^+$  influyen sobre el rendimiento en zigotos de cruces  $\rho^+$  por  $\rho^+$  y  $\rho^+$  por  $\rho^-$ , para lo cual, de una parte, las estirpes  $\rho^+$  que intervienen en los cruces se obtuvieron de cultivos en medio normal NG y en medio NL, medio este último que como ya se ha visto reduce la proporción de mutantes  $\rho^-$  y, de otra, se aumentó artificialmente en un caso la proporción de mutantes  $\rho^-$  de los cultivos de estirpes  $\rho^+$ .

Como estirpes  $\rho^+$  se emplearon las Sg-5 y Xg-5,  $\alpha$  y  $\beta$ , respectivamente, y como estirpes  $\rho^-$  las Sp-17 y Xp-6.

En los casos en que se aumentó artificialmente la proporción de mutantes  $\rho^-$ , se partió de cultivos en medio NL de la estirpe Xg-5 a los que inmediatamente antes del cruce se adicionaron suspensiones de células  $\rho^-$  hasta conseguir una propor -

Tabla 28. - Rendimiento en zigotos de cruces  $\rho^+$  por  $\rho^+$  y  $\rho^+$  por  $\rho^-$  en los que el porcentaje de células  $\rho^-$  presentes en los cultivos  $\rho^+$  ha sido alterado.

Estirpes cruzadas		Tipo de cruce	Células $\rho^-$ (%)		Rendimiento en zigotos (%)	Habilidad de cruce
<u>a</u>	<u><math>\alpha</math></u>		<u>a</u>	<u><math>\alpha</math></u>		
Sg-5	Xg-5	$\rho^+ \times \rho^+$	3	2.2	0.00370	1
Sg-5(NL)*	Xg-5(NL)*	$\rho^+ \times \rho^+$	1	0.9	0.00256	0.69
Sg-5	Xp-6	$\rho^+ \rho^-$	3	100	0.028	7.56
Sg-5(NL)*	Xp-6	$\rho^+ \times \rho^-$	1	100	0.01128	3
Sp-17	Xg-5	$\rho^- \times \rho^+$	100	2.2	0.012	3.24
Sp-17	Xg-5(NL)*	$\rho^- \times \rho^+$	100	0.9	0.0107	2.89
Sp-17	Xg-5(S)**	$\rho^- \times \rho^+$	100	27.7	0.0236	6.37

\* Estirpes  $\rho^+$  procedentes de un cultivo sobre medio NL

\*\* Estirpes  $\rho^+$  suplementada artificialmente con células  $\rho^-$

ción de las mismas del 27.7%. Las células  $\rho^-$  fueron obtenidas mediante mezcla de cultivos en condiciones normales de cinco mutantes  $\rho^-$  espontáneas seleccionadas a partir de cultivos de la estirpe  $\rho^+$  Xg-5.

Los resultados se exponen en la tabla 28 e indican, que tanto en cruces  $\rho^+$  por  $\rho^+$  como en cruces  $\rho^+$  por  $\rho^-$ , el rendimiento en zigotos es como norma mayor cuanto mayor es la proporción de células  $\rho^-$  presente en los cultivos de estirpes  $\rho^+$ .

Finalmente, se realizaron una tercera serie de experiencias en las que se determinó el rendimiento en zigotos de cruces entre estirpes supresivas y una serie de estirpes  $\rho^+$ ; así como el correspondiente a cruces entre las citadas estirpes supresivas y estirpes  $\rho^-$ , obtenidas a partir de mutantes  $\rho^-$  espontáneas seleccionadas de cultivos de cada una de las estirpes  $\rho^+$  antes citadas.

Estas experiencias a más de confirmar y ampliar los datos obtenidos hasta el momento, tuvieron por objeto el poder calcular la habilidad de cruce de cada una de las estirpes con las  $\rho^-$  supresivas en función de la correspondiente de sus mutantes espontáneas con las mismas supresivas lo que, como se verá en el próximo capítulo, sirvió para comprobar el cambio que origina en el valor de la supresividad la introducción de la habilidad de cruce como factor de corrección en el cálculo de la

misma.

Las estirpes  $\rho^+$  a empleadas fueron SER19, Sb-2 SXg4-14 y SXg4-19 ya descritas. De cada una de ellas se obtuvo una estirpe  $\rho^-$  por selección al azar de uno de los mutantes espontáneos que aparecen en sus cultivos; estirpes que se designaron como SERp-1, Sp-1, SXp4-14 y SXp4-19, respectivamente. Como estirpes  $\rho^-$ , a, supresivas se emplearon las AXp-10 y Xp-4, igualmente descritas con anterioridad en esta memoria.

Los cruces se realizaron en la forma acostumbrada y el rendimiento en zigotos se calculó como en las dos experiencias anteriores. En cada par de cruces la habilidad de cruces  $\rho^+$  por  $\rho^-$  y  $\rho^-$  por  $\rho^-$  se calculó en este caso tomando como unidad de referencia el rendimiento en zigotos del cruce  $\rho^-$  por  $\rho^-$ .

Los resultados obtenidos se exponen en la tabla 29 y muestran que, sin excepción, la habilidad de cruce de estirpes  $\rho^+$  por  $\rho^-$  supresivas es siempre menor que la de sus mutantes  $\rho^-$  por las mismas estirpes.

Tabla 29. - Estudio comparativo del rendimiento en zigotos de estirpes  $\rho^+$  y  $\rho^-$  derivadas de ellas en cruces con  $\rho^-$  supresivas

Estirpes cruzadas		Tipo cruce	Células $\rho^-$ presentes en los cultivos $\rho^+$ (%)	Rendimiento en zigotos	Habilidad de cruce (H) *
<u>a</u>	<u>a</u>				
SER19	AXp-10	$\rho^+ \times \rho^-$	16.09	0.0910	0.433
SERp-1	"	$\rho^- \times \rho^-$	-	0.2100	1
SER19	Xp-4	$\rho^+ \times \rho^-$	16.09	0.0284	0.158
SERp-1	"	$\rho^- \times \rho^-$	-	0.1800	1
Sb-2	AXp-10	$\rho^+ \times \rho^-$	16.76	0.0300	0.079
Sp-1	"	$\rho^- \times \rho^-$	-	0.3780	1
Sb-2	Xp-4	$\rho^+ \times \rho^-$	16.76	0.0036	0.157
Sp-1	"	$\rho^- \times \rho^-$	-	0.023	1
SXg4-14	AXp-10	$\rho^+ \times \rho^-$	2.77	0.0524	0.082
SXp4-14	"	$\rho^- \times \rho^-$	-	0.6380	1
SXg4-14	Xp-4	$\rho^+ \times \rho^-$	2.77	0.1768	0.164
SXp4-14	"	$\rho^- \times \rho^-$	-	1.0800	1
SXg4-19	AXp-10	$\rho^+ \times \rho^-$	6.6	0.0125	0.108
SXp4-19	"	$\rho^- \times \rho^-$	-	0.1159	1
SXg4-19	Xp-4	$\rho^+ \times \rho^-$	6.6	0.0119	0.030
SXg4-19	"	$\rho^- \times \rho^-$	-	0.4000	1

\* Referida en cada caso al rendimiento en zigotos de los cruces  $\rho^- \times \rho^-$



DISCUSSION



A lo largo del Capítulo anterior y junto con la descripción de las experiencias realizadas y los resultados obtenidos se han ido incluyendo comentarios breves sobre la posible significación e interpretación de los datos obtenidos en cada caso.

No obstante, en este capítulo, con una visión global ya de todas las experiencias realizadas creemos conveniente ampliar la discusión de los resultados obtenidos sobre todo teniendo en cuenta que la mayoría de ellos están interrelacionados.

A efectos de establecimiento de un orden se discutirá sucesivamente la conveniencia de abandonar el concepto de "supresividad" aplicado a las estirpes  $\rho^-$  y sustituirlo por el de "resistencia a la supresividad" de las estirpes  $\rho^+$ ; la relación entre la citada resistencia de la estirpe  $\rho^+$  y la estabilidad respiratoria de las mismas; la naturaleza de los determinantes genéticos responsables de la estabilidad, la transmisión de la estabilidad respiratoria por estirpes  $\rho^-$  y la influencia que los agentes externos ejercen sobre la estabilidad de las estirpes  $\rho^+$ .

Finalmente y basándonos en las experiencias realizadas sobre la habilidad de cruce de las distintas estirpes empleadas, se discutirá la conveniencia de abandonar la forma clásica empleada en el cálculo de la supresividad y su sustitución por otra que proponemos.

### "Supresividad" y "Resistencia a la Supresividad"

Como ya se ha indicado en la Introducción el término "supresividad", fue acuñado por Ephrussi y col. para designar la propiedad que presentan algunas estirpes  $\rho^-$ , cuando se cruzan con estirpes  $\rho^+$ , para excluir o suprimir el factor rho normal aportado a los cigotos por estas últimas. Las estirpes  $\rho^-$  que presentan esta propiedad reciben el nombre de "supresivas", frente al de "neutras" que se adjudica a las que no la poseen.

El grado de supresividad que presentan las distintas estirpes supresivas es variable, pero en cualquier caso la escuela de Ephrussi y de todos los autores que han trabajado sobre el tema consideran que es una característica celular de las estirpes  $\rho^-$ , que presentarían una notable estabilidad en relación con esta propiedad.

Aparte de los antecedentes citados en la Introducción,

los resultados obtenidos en este trabajo obligan a afirmar que, definitivamente, la supresividad de una estirpe  $\rho^-$ , no puede ser considerada como un carácter constante de la misma, sino que puede aumentar, disminuir y hasta llegar a anularse, según la estirpe  $\rho^+$  con la que se cruce.

Efectivamente, en los estudios realizados en esta memoria se han manejado dos estirpes supresivas. La AXp-10 y la Xp-4, aunque principalmente la primera. Pues bien, en la tabla 30 se ha hecho una recopilación de los datos obtenidos en el transcurso de este trabajo sobre la supresividad de ambas estirpes frente a distintas estirpes  $\rho^+$  y como puede verse la conclusión es evidente: la estirpe AXp-10 se comporta desde altamente supresiva ( $S\% = 77.7$ ) hasta neutra ( $S\% = 0$ ), pasando por todos los estadíos intermedios, según la estirpe  $\rho^+$  frente a la que se prueba su supresividad; en cuanto a la Xp-4, si bien se dispone de menos datos, se comportará desde medianamente supresiva ( $S\% = 47.2$ ) hasta prácticamente neutra ( $S\% = 4.2$ ). No dudamos que de haber efectuado mayor número de experiencias con esta última estirpe se habrían obtenido resultados aún más semejantes a los encontrados en el caso de la AXp-10.

Es indudable, pues, que la supresividad no depende exclusivamente de las estirpes  $\rho^-$  y que su valor para una determinada oscila grandemente. No obstante, también en el transcurso de este trabajo se han aislado mutantes  $\rho^-$  que en ningún ca-

so suprimen el carácter rho lo que, en principio, y sin desechar totalmente la posibilidad de que puedan existir estirpes  $\rho^+$  frente a las que sean supresivas, nos lleva a aceptar la existencia de estirpes  $\rho^-$  neutras frente a otras supresivas, las cuales según la estirpe  $\rho^+$  frente a la que se cruce, pueden excluir o eliminar el factor rho de los cigotos.

El concepto de estirpe supresiva de levaduras, pues, cambia radicalmente ya que de designar a aquellas estirpes que cuando se cruzan con estirpes  $\rho^+$  excluyen o suprimen el factor rho normal aportado a los cigotos por estas últimas, pasa a designar a aquellas estirpes  $\rho^-$  que según el tipo de estirpe  $\rho^+$  con la que se cruza pueden excluir o suprimir de los cigotos el citado factor rho.

De acuerdo con este nuevo concepto de estirpe supresiva, resulta incorrecto hablar de "supresividad" de estirpes  $\rho^-$  y mucho más cuantificar la misma si quiera a efectos comparativos, ya que, como puede extraerse de la tabla 30, la estirpe Xp-4 muestra más del doble de la supresividad de AXp-10 cuando ambas se cruzan con la SXg4-19 (S% igual a 30.2 y 12.2 respectivamente) mientras que cuando se cruzan con la Sb-2 es la AXp-10 la que muestra un valor de supresividad doble que el de la Xp-4 (S% = 59.9 y 29.3 respectivamente).

Aún cuando el grado de supresividad de una estirpe  $\rho^-$  frente a otra  $\rho^+$  determinada es constante, en nuestra opi

Tabla 30. - Variación de los valores de la supresividad de las es  
tirpes AXp-10 y Xp-4 en cruces con distintas estirpes  
rho<sup>+</sup>

Cruces	S%	Cruces	S%
AXp-10 x Sbg-13	77.7	AXp-10 x Sbg22-18	1.2
AXp-10 x Sbg-15	63.3	AXp-10 x Sbg22-4	0
AXp-10 x Sb-2	59.9	AXp-10 x Sbg22-8	0
AXp-10 x SER19	51.3	Xp-4 x SXg4-14	47.2
AXp-10 x SERg-1	41.6	Xp-4 x SXg4-19	30.2
AXp-10 x SERg-15	38.6	Xp-4 x Sb-2	29.3
AXp-10 x SERg-14	23.3	Xp-4 x SER19	27.9
AXp-10 x Sbg-22	18.9	Xp-4 x SXg4-125	17.4
AXp-10 x SXg4-19	12.2	Xp-4 x Sbg22-9	10
AXp-10 x Sbg22-2	4.4	Xp-4 x SXg4-27	4.2
AXp-10 x Sbg22-3	9.6		

nión y a la vista de las circunstancias expuestas la manera correcta de cuantificar el fenómeno e incluso de investigar su naturaleza es refiriendolo a las estirpes  $\rho^+$ , que, en definitiva, son las que permiten la manifestación o no de la capacidad de la estirpe supresiva para eliminar el factor rho normal de los cigotos.

Es por ello que proponemos y así se ha utilizado tanto en el título como en el desarrollo del trabajo el uso de la expresión " Resistencia a la supresividad" para designar el grado de resistencia que ofrecen las estirpes  $\rho^+$  a la manifestación del carácter supresivo de las estirpes  $\rho^-$ . A efectos numéricos la resistencia a la supresividad (RS) se expresa como porcentaje de cigotos no suprimidos en los cruces con estirpes  $\rho^-$  supresivas y viene expresada por la fórmula  $RS\% = 100 - S\%$ , en la que  $S\%$  es la supresividad por ciento de las estirpes  $\rho^-$  frente a las estirpes  $\rho^+$  que se considere.

Una vez sentadas estas conclusiones que consideramos básicas y que, como es lógico, anulan prácticamente casi todo lo escrito sobre supresividad en levaduras, hay que plantearse el problema de qué factores condicionan la resistencia de las estirpes  $\rho^+$  al poder supresivo de las  $\rho^-$ .

### Resistencia a la supresividad y estabilidad respiratoria

De los datos expuestos en los apartados 1 y 2 del ca-



párrafo anterior parece deducirse una consecuencia inmediata: todas aquellas estirpes que, aún procedentes de otras inestables, muestran una estabilidad respiratoria alta muestran igualmente un alto grado de RS frente a estirpes supresivas.

Por lo que respecta a la RS frente a la estirpe AXp-10 resulta especialmente ilustrativo el caso del clono Sbg-22, obtenido por segregación mitótica de la estirpe Sb-2, que presenta un porcentaje de células  $\rho^-$  en cultivos estacionarios de 3.15 frente al de 16.7 de la estirpe de que procede. Pues bien, no sólo presenta una RS de 81.1% frente a la de 40.1% de la estirpe Sb-2 sino que los 20 clones obtenidos a partir de él con un porcentaje medio de 3.79 células  $\rho^-$  (Tabla 5) muestran una RS media del 93.53% con una desviación típica inferior al 3% de la media (Tabla 11).

Otros dos casos llamativos, en que la estabilización respiratoria lleva consigo un enorme aumento de la RS, lo constituyen los expuestos en las tablas 15 y 16. Puede observarse en la primera de ellas cómo 10 estirpes derivadas de la inestable -SER-19 por cruzamiento con la AXp-10 y posterior segregación meiótica y que presentan un porcentaje medio de células  $\rho^-$  de 2.41, arrojan un porcentaje medio de RS del 85.8%, con una desviación típica inferior al 10% de la media, frente a la RS de la SER-19 ( $\rho^- = 16.1$ ) que es sólo del 48.7%.

En la segunda de las tablas citadas puede observarse cómo 7 estirpes, que han sufrido una ulterior estabilización mediante un nuevo cruce con la AXp-10 y posterior segregación meiótica y que presentan un porcentaje medio de  $\rho^-$  de 1.04 arrojan una RS media del 95.1%, con una desviación típica inferior al 1.2% de la media. Es decir todas ellas se comportan como si prácticamente la AXp-10 fuese una estirpe neutra.

Por lo que respecta a la estirpe Xp-4, aunque como ya se ha dicho, los datos de que se disponen sobre esta estirpe son escasos, en la tabla 14 puede observarse cómo las estirpes con un grado de estabilidad alto muestran también un alto grado de resistencia al poder supresivo de esta estirpe  $\rho^-$ .

Finalmente como ya se ha expuesto en el capítulo anterior y a pesar de los numerosos intentos realizados ha sido imposible obtener un mutante  $\rho^-$  de la serie S que sea supresivo para la estirpe X-3 o derivadas de la misma. Dada la gran estabilidad respiratoria de la citada estirpe, creemos que ello se debe no a que no existan mutantes supresivos de la serie S, sino a que al ser la X-3 grandemente resistente a la supresividad, ha sido imposible poner de manifiesto dicho carácter.

En nuestra opinión, por tanto, una estabilidad respiratoria alta condiciona una alta RS de las estirpes  $\rho^+$ .

Surge entonces la cuestión de determinar a que se

debe la estabilidad respiratoria de una estirpe  $\rho^+$  que condiciona la existencia de estirpes estables y con diversos grados de estabilidad.

De las experiencias expuestas en el apartado 1 se deduce, en principio que la estabilidad mayor o menor de una estirpe  $\rho^+$ , referida al porcentaje de células  $\rho^-$  presentes en sus cultivos en fase estacionaria, es el resultado de la inestabilidad, es decir de la habilidad para segregar por mitosis células  $\rho^-$  hijas de cada una de las células que componen la población.

La única contradicción a lo anteriormente dicho, lo constituyen los resultados encontrados al analizar la estabilidad respiratoria de los 25 clones obtenidos de la estirpe SER-19 -con un 16.1% de  $\rho^-$ - que muestran un porcentaje medio de células  $\rho^-$  del 26.7% y las encontradas al analizar los 20 clones seleccionados del SERg-3 -con un 13.7% de  $\rho^-$ - que muestran un porcentaje medio de células  $\rho^-$  del 26.7% y las encontradas al analizar los 20 clones seleccionados del SERg -3 con un 13.7% de  $\rho^-$ - que muestran un porcentaje medio de células  $\rho^-$  del 41.9%; porcentaje medio muy superior, en ambos casos, al de las estirpes de que se derivan.

Independientemente de que el número de clones seleccionados en cada caso, 25 y 20 respectivamente, no sea lo suficientemente elevado como para asegurar que constituyen una muestra representativa, la única explicación posible a este hecho po

dría consistir en que, independientemente de la estabilidad de cada una de las células  $\rho^+$  presentes en los cultivos de las estirpes inestables, al haberse mantenido durante un tiempo prolongado en cultivo las estirpes analizadas, las células  $\rho^+$ , más competentes desde el punto de vista fisiológico, son seleccionadas - con respecto a las  $\rho^-$  hasta llegar a un equilibrio, cosa que no ocurriría en aquellos casos en que los clones son inmediatamente analizados después de su aislamiento.

Esto explicaría el hecho de que a pesar de la heterogeneidad de los clones aislados de las estirpes de partida SER19 y Sb-2, éstas que son conservadas por resiembras periódicas cada 15 días, siempre muestran un porcentaje de mutantes  $\rho^-$  constante.

Esta hipótesis fue verificada observando la evolución del porcentaje de células  $\rho^-$  de varios clones con un alto grado de inestabilidad o a lo largo de cuatro resiembras sucesivas espaciadas por períodos de 15 días en medio NG. Los resultados se exponen en la tabla 31 y muestran cómo el porcentaje de células  $\rho^-$  presentes en los cultivos va descendiendo, hasta alcanzar en ocasiones valores inferiores a los de las estirpes originales.

Aún contando con estos datos es evidente que las dos experiencias citadas contrastan con las restantes, pero, en cualquier caso y prescindiendo de los valores medios, la gran dispersión que muestran los porcentajes de células  $\rho^-$  en los distintos

Tabla 31. - Evolución del porcentaje de células  $\rho^-$  presentes en cultivos de clones inestables, derivados de las es-  
tirpes SER-19\* y Sb-2\*, cuando se someten a re-  
siembras sucesivas en medio NG.

Clonos	Células $\rho^-$ (%)			
	R e s i e m b r a :			
	Ninguna	Primera	Segunda	Tercera
SERg-3	13.7	11	11.9	11.3
SERg-13	51.2	24.3	23.2	15.2
SERg-13-7	54.2	39.1	40.7	22.9
Sbg-9	46.8	19.6	16.09	7.3
Sbg-9-15	57.1	51	51.2	42.9

\* %  $\rho^-$  de SER19 % 16.1;

%  $\rho^-$  de Sb-2 = 16.7

clonos analizados nos llevan a concluir, como se expresó anteriormente, que el grado de inestabilidad de una estirpe, medida por el porcentaje de células  $\rho^-$  presentes en sus cultivos en fase estacionaria, es el resultado de la inestabilidad individual de las células  $\rho^+$  presentes en los mismos.

Quedan no obstante por explicar las excepciones representadas por los clones Sbg-3, Sbg9-12, Sbg9-15, Sbg9-17, Sbg9-18 y Sbg9-19, que presentan una RS del 100% cuando su estabilidad, de acuerdo con el porcentaje de mutantes  $\rho^-$  que muestran, es muy baja. En el apartado en que se discute la naturaleza genética de los determinantes que condicionan la estabilidad se da una explicación lógica de estos resultados aparentemente contradictorios con la conclusión anterior.

#### Determinantes genéticos que condicionan la estabilidad

Admitida esta conclusión, se plantea la siguiente cuestión: ¿Cuál es la naturaleza de los determinantes genéticos que condicionan el que unas células  $\rho^+$  segreguen mutantes  $\rho^-$  con una mayor frecuencia que otras ?.

"A priori" se pueden admitir dos alternativas:

a. - La estabilidad del factor  $\rho$ , que como se expuso en la intro

ducción se identifica hoy día con el ADN mitocondrial, estaría condicionada por un alelo nuclear necesario para el mantenimiento de la misma.

b. - La estabilidad del factor rho, estaría condicionada por la propia naturaleza del mismo. Es decir una célula  $\text{rho}^+$  podría poseer una población de ADNs mitocondriales mezcla de unos altamente estables, otros inestables, y otros ya alterados ( $\text{rho}^-$ ). Al repartirse al azar la dotación citoplasmática entre las células hijas, algunas de ellas serían altamente estables, (predominio de ADNs mitocondriales estables), otra porción seguirían siendo inestables (mezcla de ADNs mitocondriales del mismo tipo que la célula madre, de ADN estables y  $\text{rho}^-$  o bien de ADN inestables y  $\text{rho}^-$ ) y la tercera serían  $\text{rho}^-$ .

Con los datos discutidos hasta el momento, cualquiera de las dos alternativas podría ser válida, ya que el clono Sbg-22 podría ser el resultado de una mutación nuclear, y la estabilización de la progenie haploide procedente de los cigotos fruto de los cruces de la SER19 por AXp-10 podría obedecer a que los cigotos  $\text{rho}^+$  no suprimidos procediesen de células  $\text{rho}^+$  con la misma mutación nuclear antes citada.

Para dilucidar esta cuestión se realizaron las experiencias expuestas en el apartado 3 del capítulo anterior, en las que se analizó la estabilidad respiratoria -tasa de mutación a  $\text{rho}^-$ - de la

progenie haploide de cigotos obtenidos por cruce entre una estirpe inestable (SER19) y otra  $\rho^-$  supresiva (AXp-10). Caso de que los determinantes genéticos que condicionan la estabilidad respiratoria y por ende la resistencia a la supresividad fueran de naturaleza nuclear, la segregación del carácter "estable" debería ser 2:2, o bien 4:0 si la estirpe supresiva AXp-10 poseyese también el alelo responsable de la estabilización.

Los resultados (Tablas 17, 18 y 19) demuestran que no se obtienen ninguno de estos dos resultados ya que no sólo el 75.5, 79.2, y 81.8% de la progenie haploide mostró una tasa de mutación a  $\rho^-$  inferior a la de la estirpe  $\rho^+$  de partida, sino que los valores mostraron una gran dispersión. Por si fuera poco, el análisis de la progenie haploide de un cigoto obtenido por cruce entre una estirpe seleccionada entre las estabilizadas por el cruce anterior (SXg1-31, con una tasa de mutación de  $1.28 \times 10^{-2}$ ) con la misma estirpe AXp-10 supresiva, demostró que el 88.4% de las mismas poseía una tasa de mutación inferior a la estirpe madre  $\rho^+$ , aunque en este caso como la estirpe es bastante estable, los valores muestran una dispersión algo menor (Tabla 20).

En nuestra opinión estas experiencias constituyen un claro ejemplo de herencia citoplasmática y demuestran, por tanto, que los determinantes genéticos que condicionan la estabilidad respiratoria y la resistencia a la supresividad son de natura



leza citoplasmática; en suma el propio factor rho o ADN mitocondrial.

Esta conclusión explica satisfactoriamente tanto la segregación mitótica de clonos  $\rho^+$  estables a partir de estirpes inestables, como la estabilización de la progenie haploide de cigotos procedentes de cruces de estirpes  $\rho^+$  inestables por  $\rho^-$  supresivas.

En el primer caso, al existir en las células  $\rho^+$  del cultivo bien una mezcla de una minoría de unidades de ADN mitocondrial estables ( $\rho^E$ ) con una mayoría de inestables ( $\rho^I$ ) e incluso alteradas ( $\rho^-$ ), o bien una mezcla de  $\rho^I$  y  $\rho^-$  o bien  $\rho^E + \rho^-$ , el reparto al azar de las mismas entre las células madre e hija, originaría un escaso número de células  $\rho^+$  con predominio de unidades estables (caso de la Sbg-22) y una mayoría de  $\rho^+$  que seguirían siendo inestables ( $\rho^E + \rho^I + \rho^-$ ,  $\rho^E + \rho^-$  o bien  $\rho^I + \rho^-$ ), a más de un conjunto de células  $\rho^-$  mayor o menor, según la tasa de mutación del ADN mitocondrial inestable y el número de unidades  $\rho^-$  preexistentes.

Como es lógico una vez surgida una célula con predominio de unidades mitocondriales estables, su descendencia tendría a ser cada vez más estable (caso de la descendencia del clono Sbg-22).

En el segundo caso, el carácter supresivo de la estirpe  $\rho^-$  sólo tendría efecto en aquellas células carentes de unidades estables o que las poseyesen en muy escaso número. Es decir

el factor  $\rho^-$  o ADN mitocondrial supresivo eliminaría del cigoto, probablemente por recombinación, todas o la mayoría de las unidades  $\rho^I$ , con lo cual en un cruce de una estirpe  $\rho^+$  inestable por  $\rho^-$  supresiva todos o la mayoría de los cigotos  $\rho^+$ , que aparecerían serían aquellos que poseen una dotación mayor o menor unidades de ADN mitocondrial estable, unidades que al ser transmitidas a la progenie de forma selectiva en la meiosis asegurarían la mayor estabilidad respiratoria de la misma.

El hecho de que las unidades  $\rho^I$  sean eliminadas selectivamente y no las  $\rho^E$  tiene una fácil explicación si se considera que los primeros poseen en la cadena de ADN un mayor número de "espaciadores" o secuencias A:T no transcribibles, que al mismo tiempo que condicionan su inestabilidad, al favorecer los entrecruzamientos intracatenarios y la formación y excisión de bucles, origen de grandes borraduras, aumentarían la probabilidad de recombinación con los ADNs mitocondriales  $\rho^-$ , con grandes secuencias también de A:T no transcribibles.

Quedaría así explicada tanto la aparición de clones estables por segregación mitótica a partir de estirpes inestables como la estabilización de la progenie haploide de éstas cuando se cruzan con una  $\rho^-$  supresiva.

Finalmente también se explicaría la aparición de clones inestables que muestran una RS del 100% a que antes se ha hecho mención: procederían de células cuya dotación mitocondrial fuese  $\rho^E + \rho^-$  con predominio de estas últimas. Estas célu -

las segregarían el fenotipo  $\text{rho}^-$  con alta frecuencia, pero al no ser eliminado el  $\text{rho}^E$  de los cigotos, todas las células con fenotipo  $\text{rho}^+$  originarían cigotos con fenotipo igualmente  $\text{rho}^+$ , con lo que la RS sería del 100%.

#### Transmisión de la estabilidad respiratoria por células $\text{rho}^-$

Las experiencias expuestas en el apartado 4 del capítulo anterior constituyen un elemento discordante dentro del conjunto de experiencias que se ha comentado. Efectivamente, realizadas con miras a reafirmar que es únicamente el carácter supresivo de las estirpes  $\text{rho}^-$  el responsable de la estabilización respiratoria y, por tanto de la RS de la progenie haploide de los cigotos obtenidos en cruces con  $\text{rho}^+$  inestables, los resultados obtenidos obligan a reconsiderar o completar esta conclusión, ya que demuestran que la estirpe  $\text{rho}^-$ , aún no siendo supresiva, es capaz de originar la estabilización de la citada progenie haploide; estabilización que no se logra si la estirpe  $\text{rho}^-$  a más de no ser supresiva procede de una estirpe inestable.

Estos resultados sorprendentes, sólo tienen una posible explicación: el genomio mitocondrial  $\text{rho}^-$  procedente de una célula estable, carente de capacidad supresiva, conserva un alelo responsable de la estabilidad y por recombinación con el rho<sup>+</sup> los transfiere a este último que queda convertido en geno-

mio mitocondrial  $\rho^E$ . Proponemos la denominación de gen[EST] para el alelo antes aludido y a título de sugerencia creemos posible que su papel sea el de controlar la integración y excisión de trozos de ADN intra o extracatenario en las zonas espaciadoras del genomio mitocondrial.

El hecho de que no se sumen los efectos estabilizadores en el caso de genomios supresivos procedentes de células estables refuerza la conclusión anterior ya que, como se expuso en la Introducción, los ADNs mitocondriales supresivos, presentan alteraciones profundas motivadas por grandes borraduras, que eliminarían el alelo responsable de la estabilidad del factor  $\rho$ .

La estabilización de la progenie haploide de cigotos obtenidos en cruces de  $\rho^-$  con  $\rho^+$  inestables puede alcanzarse, pues, por dos mecanismos independientes: eliminación de las unidades  $\rho^+$  por los  $\rho^-$  supresivos o conversión a  $\rho^E$  por recombinación con los  $\rho^-$  no supresivos, originados estos últimos por mutaciones puntuales o de cambio de secuencia en un gen de los ADNs mitocondriales estables.

#### Influencia de los agentes exteriores sobre la estabilidad respiratoria y resistencia a la supresividad

Los resultados de las experiencias expuestas en el

apartado 5 apenas si merecen ser comentados: ni la fase de crecimiento de la estirpe  $\rho^+$ , ni la modalidad de cultivo, ni el pH del medio ejercen un efecto apreciable sobre la estabilidad respiratoria (% de células  $\rho^-$ ) ni sobre la resistencia a la supresividad de las estirpes ensayadas.

Solamente en el caso del reemplazamiento de la glucosa por el lactato como fuente de carbono, se observa, como es lógico, un menor porcentaje de células  $\rho^-$  en los cultivos en fase estacionaria, ya que éstas no pueden reproducirse en el medio empleado, y un aumento en la RS, extremo este último que sí merece comentario.

En principio parece lógico que una estirpe cuyos cultivos son más estables debería mostrar, de acuerdo con lo mantenido a lo largo de esta discusión, una mayor RS; sin embargo ello es solo aparente. Téngase en cuenta que la estirpe aún después de cultivada en lactato sigue siendo genéticamente inestable y que por tanto no hay razón para que su dotación de ADNs mitocondriales se comporte de forma distinta frente a los aportadas por la estirpe  $\rho^-$  supresiva.

En el apartado siguiente se expondrá cómo la mayor habilidad de cruce entre células  $\rho^-$  falsea los datos sobre el valor de la supresividad, y por tanto de RS, cuando se calcula por la fórmula clásica de Sherman y Ephrussi. En el caso de estirpes inestables cultivadas en medios con lactato el porcentaje de célu-

las  $\rho^-$  disminuye casi a un tercio del presente en medios con glucosa; ello indudablemente traerá consigo una disminución del porcentaje de cigotos  $\rho^-$  que se obtienen en el cruce, con el consiguiente aumento de los  $\rho^+$  y por consiguiente un aumento aparente de la RS.

Concluimos, por tanto, que tampoco la naturaleza de la fuente de carbono influye sobre la resistencia a la supresividad.

#### Consideraciones sobre el cálculo de la supresividad

Como se ha expuesto en el apartado 6 del capítulo anterior, hemos podido confirmar, de acuerdo con González (1974), que efectivamente, tal como se deduce de los resultados mostrados en la tabla 27, el rendimiento en cigotos es muy distinto en cruces  $\rho^+$  por  $\rho^+$ ,  $\rho^+$  por  $\rho^-$  y  $\rho^-$  por  $\rho^-$ , hasta el punto de que en este último caso, el citado rendimiento es aproximadamente 100 y 10 veces mayor que en el caso de cruces  $\rho^+$  por  $\rho^+$  y  $\rho^+$  por  $\rho^-$  respectivamente.

Igualmente, en la tabla 28 se puede comprobar cómo el rendimiento en cigotos de cruces  $\rho^+$  por  $\rho^-$  e incluso  $\rho^+$  por  $\rho^+$  es siempre mayor cuando lo es la proporción de células  $\rho^-$  presentes en los cultivos  $\rho^+$ , aunque ello se deba exclusivamente a circunstancias ambientales o a manipulaciones de laboratorio.

En tales circunstancias es evidente que la fórmula de Sherman y Ephrussi no es válida para calcular el poder supresivo de una estirpe  $\rho^-$  con respecto a una determinada  $\rho^+$ , ya que el porcentaje de zigotos  $\rho^-$  que aparecen en el cruce será la resultante no sólo del poder supresivo de la estirpe  $\rho^-$  y el número de células  $\rho^-$  presentes en los cultivos  $\rho^+$ , sino además de la mayor habilidad de cruce entre dichas células  $\rho^-$  y las supresivas y, como consecuencia de ello, los valores que se obtengan mediante el empleo de la citada fórmula serán siempre superiores a los reales.

Se impone por tanto llegar a una nueva formulación para el cálculo del poder supresivo de una estirpe  $\rho^-$ , en la que se introduzca una corrección que tenga en cuenta el aumento en el número de zigotos  $\rho^-$  como consecuencia de la mayor habilidad de cruce entre células  $\rho^-$  que entre  $\rho^+$  y  $\rho^-$ .

Un planteamiento teórico, en nuestra opinión correcto, sería el que a continuación se expone: Consideremos un cruce entre una estirpe  $\rho^+$  - cuyos cultivos en fase estacionaria presenten un porcentaje de células  $\rho^-$  igual a  $Y^-$  y otra  $\rho^-$  supresiva; Denominamos  $H$  a la habilidad de cruce entre las células  $\rho^+$  y  $\rho^-$ , referida al rendimiento en zigotos obtenido en cruces entre los mutantes  $\rho^-$  del cultivo  $\rho^+$  y las células  $\rho^-$  supresivas. ( $H = \text{rendimiento en zigotos del cruce } \rho^+ \times \rho^- \text{ supresivas/}$

rendimiento en zigotos del cruce  $\rho^-$  por  $\rho^-$  supresivas) y, finalmente llamemos X al porcentaje de zigotos  $\rho^-$  que aparecen después de verificado el cruce.

Tomemos 100 células del cultivo  $\rho^+$ ; en ellas existirán  $100 - Y$  células  $\rho^+$  e  $Y$  células  $\rho^-$ . Prescindiendo por el momento de la supresividad, la cantidad teórica de zigotos que obtendríamos al cruzar dichas 100 células con otras tantas  $\rho^-$  sería de

$(100 - Y) H$  zigotos  $\rho^+$  +  $Y$  zigotos  $\rho^-$  de donde, refiriendo a 100 el número total de zigotos obtenidos, se deduce que el porcentaje teórico de zigotos  $\rho^-$  ( $X_T$ ) que se obtiene en el cruce, sería,

$$\frac{(100 - Y) H + Y}{Y} = \frac{100}{X_T} ; \quad X_T = \frac{100 Y}{(100 - Y) H + Y} \quad (1)$$

Como el porcentaje real de zigotos  $\rho^-$  que se obtienen en el cruce es X, quiere decir que si X es mayor que  $X_T$ , la diferencia  $X - X_T$  representará el porcentaje de zigotos  $\rho^-$  que aparecen como consecuencia del poder supresivo de la estirpe  $\rho^-$  ( $X_S$ ).

$$X_S = X - X_T$$

de donde sustituyendo  $X_T$  por su valor en función de Y y H (1), se obtiene:



$$X_S = X - \frac{100 Y}{(100 - Y) H + Y} = \frac{XH (100 - Y) + XY - 100Y}{H (100 - Y) + Y} \quad (2)$$

$X_S$  sería el porcentaje de cigotos suprimidos que aparece como consecuencia del cruce de  $100 - Y$  células  $\rho^+$  con las  $\rho^-$  supresivas; para calcular la supresividad por ciento ( $S\%$ ) hay que referir  $X_S$  a 100 células  $\rho^+$  de partida

$$\frac{100 - Y}{X_S} = \frac{100}{S\%} \quad \text{o sea } S = \frac{100 X_S}{100 - Y} \quad (3)$$

Con lo que sustituyendo en (3) el valor de  $X_S$ , la (2), y simplificando, se llega finalmente a la ecuación.

$$S\% = \frac{XH - Y \frac{100 - X}{100 - Y}}{H (100 - Y) + Y} \cdot 100$$

fórmula que proponemos para el cálculo de la supresividad.

Como puede observarse si en esta fórmula  $H$  se hace igual a la unidad, queda reducida a

$$S\% = \frac{X - Y}{100 - Y} \cdot 100$$

que es la misma propuesta por Sherman y Ephrussi.

Las diferencias que en el valor de la supresividad de las estirpe  $\rho^-$  introduce el uso de nuestra fórmula, pueden apreciarse en la tabla 32, en la que comparan los obtenidos mediante la de Sherman y Ephrussi en una serie de cruces. Los valores de H incluidos en esta tabla son los calculados en base a los datos mostrados en la tabla 29.

Como era de esperar los valores de la  $S\%$  calculados de acuerdo con nuestra fórmula son siempre más bajos, y, en ocasiones negativas, que cuando se calculan por la fórmula de Sherman y Ephrussi. Ahora bien así como consideramos que el planteamiento teórico que nos ha llevado a esta fórmula es correcto, también consideramos que los datos que se exponen en la tabla 32 no son fiables.

Efectivamente, el índice H de habilidad de cruce ha sido calculado, tal como se expresa en la tabla 29, comparando el rendimiento en zigotos de cruces de células  $\rho^+$  por  $\rho^-$  supresivas con el de cruces de un mutante  $\rho^-$  espontáneo, escogido al azar de entre los que aparecen en los cultivos de la estirpe  $\rho^+$ , con las mismas  $\rho^-$  supresivas. Es evidente, de una parte, como se desprende de la tabla 27, que el rendimiento en zigotos de cruces  $\rho^-$  por  $\rho^-$  varía grandemente según las distintas estirpes que se consideran y, de otra, que a partir de una estirpe  $\rho^+$  se puede originar mutantes  $\rho^-$  de muy diversas características. Por consiguiente el valor de H que hemos

empleado no puede ser considerado como representativo del de todas las células  $\rho^-$  presentes en los cultivos  $\rho^+$ . Para la aplicación correcta de la fórmula que proponemos, consideramos que debe ser empleado un factor corrector H que como mínimo - sea la media de los correspondientes a 10 mutantes espontáneos escogidos al azar y que el error de dicha media no debe ser superior al 5% de su valor.

Tabla 32. - Valores de la S% de las estirpes AXp-10 y Xp-4 frente a diversas estirpes rho<sup>+</sup> calculadas mediante la fórmula de Sherman y Ephrussi y la propuesta en esta.Tesis.

Cruces	Y*	X*	H*	S%	
	(%)	(%)	(%)	Sherman y Ephrussi	Fórmula propuesta
SER19 por AXp-10	16.09	39.5	0.433	51.29	10.43
SER19 por Xp-4	16.09	59.13	0.158	27.9	5.13
Sb-2 por AXp-10	16.76	66.66	0.079	59.95	Negativa
Sb-2 por Xp-4	16.76	41.17	0.157	29.32	Negativa
SXg4-14 por AXp-10	2.77	30.14	0.082	28.15	4.21
SXg4-14 por Xp-4	2.77	48.7	0.164	47.24	34.87
SXg4-19 por AXp-10	6.6	18.03	0.108	12.24	Negativa
SXg4-19 por Xp-4	6.6	34.85	0.030	30.25	Negativa

\* Y = % de células rho<sup>-</sup> en cultivos en fase estacionaria de la estirpe rho<sup>+</sup>

\* X = % de zigotos rho<sup>-</sup> obtenidos en el cruce

\* H = habilidad de cruce de las células rho<sup>+</sup> por rho<sup>-</sup>

CONCLUSIONES



- 1<sup>a</sup>. - La supresividad de las estirpes rho<sup>-</sup> de Saccharomyces cerevisiae no es una característica constante de las mismas, sino que varía ampliamente y hasta llega a ser nula, dependiendo del tipo de la estirpe rho<sup>+</sup> frente a la que se comprueba.
- 2<sup>a</sup>. - En sentido estricto no existen, pues, "estirpes supresivas" sino sólo un tipo de estirpes rho<sup>-</sup> que, según las rho<sup>+</sup> con las que se cruzan, pueden excluir o suprimir el factor rho normal aportado a los cigotos por estas últimas.
- 3<sup>a</sup>. - Aún cuando la supresividad de una estirpe rho<sup>-</sup> es constante frente a otra rho<sup>+</sup> determinada, se considera que el fenómeno debe cuantificarse refiriéndolo a las estirpes rho<sup>+</sup>, por lo que se propone la expresión "resistencia a la supresividad", para designar el grado de resistencia que ofrece, en cada caso, una estirpe rho<sup>+</sup> a la manifestación del carácter supresivo de estirpes rho<sup>-</sup>.
- 4<sup>a</sup>. - La mayor o menor resistencia a la supresividad de una estirpe rho<sup>+</sup> viene condicionada por la (mayor o menor) estabilidad respiratoria de sus células.
- 5<sup>a</sup>. - La estabilidad respiratoria de las células rho<sup>+</sup>, y por tanto su resistencia a la supresividad está condicionada por la -

presencia en las mismas de unidades estables de ADN mitocondrial ( factor  $\rho$  ), cuya baja tasa de mutación a  $\rho^-$  no depende de ningún alelo nuclear.

6ª. - Existe un alelo mitocondrial, (EST) que condiciona la estabilidad de los genomios mitocondriales.

7ª. - Se considera que los factores de tipo ambiental no afectan la resistencia a la supresividad.

8ª. - Se propone una nueva fórmula para el cálculo de la supresividad de una estirpe  $\rho^-$  frente a otra  $\rho^+$  determinada, en sustitución de la de Sherman y Ephrussi, en la que se introduce un factor corrector que elimina los errores derivados de la mayor habilidad que muestran las células  $\rho^-$  para cruzarse entre sí que con las células  $\rho^+$ .



## BIBLIOGRAFIA



- ARAKATSU, Y. 1972. "Action of acriflavine on the growth and mutation yeast". Mutation Res. 14, 165-184.
- ARCA, M., CANEVA, R., FRONTALI, L., TECCE, G. 1971. "Mutazione piccola colonia del lievito ed azione delle acridine sulla DNA". Lincei - Rend, Sc. Fis. Mat. e Nat. 51. 579-586.
- ARIAS DE SAAVEDRA, J.M., 1974. "Regulación de la citrato sintasa en levadura". Tesis Doctorales de la Universidad de Granada, 45.
- AVERS, C. J., PFEFFER, C. R. and RANCOURT, M. W. 1965. "Acriflavine induction of different kinds of "petite" mitochondrial populations in Saccharomyces cerevisiae". J. Bacteriol. 90, 481-494.
- BECH-HANSEN, N. T., and RANK, G. H. 1972. "Ethidium-bromide resistance and petite induction in -

- Saccharomyces cerevisiae". Can. J. Genet. Cytol. 14, 681-689.
- BERNARDI, G., CARNEVALI, F., NICOLAIEFF, A., PIPERNO, G. and TECCE, G. 1968. "Separation - and characterization of a satellite DNA from a yeast cytoplasmic petite mutant". J. Mol. Biol. 37, 493-505.
- BERNARDI, G., PIPERNO, G. and FONTY, G. 1972. "The - mitochondrial genome of wild-type yeast cells. I. Preparation and heterogeneity of mitochondrial DNA". J. Mol. Biol. 65, 173-189.
- BORST, P., KROON, A.M. 1969. "Mitochondrial DNA. Physiochemical properties, replication and genetic function". Int. Rev. Cytol. 26, 107-190.
- BULDER, C. J. E. A. 1964a. "Induction of petite mutation and inhibition of synthesis of respiratory enzymes in various yeast". A. van Leeuwenhoek, 30, 1-9.
- BULDER, C. J. E. A. 1964b. "Lethality of the petite mutation in petite negative yeast". A. van Leeuwenhoek, - 30, 442-454.
- BUTOW, R. A., WEISLOGEL, P.O. and CADERBAUM, A. 1971. "Cold sensitive mutants in yeast defective in - mitochondrial function". Fed. Proc. 30, 1225.

- CALLAO, V. y MONTOYA, E. 1960. "Actividad catalasa de mutantes de Saccharomyces cerevisiae con deficiencia respiratoria". Laboratorio, agosto, 101-106.
- CARNEVALI, F. and LEONI, L. 1972. "Intramolecular heterogeneity of yeast mitochondrial DNA". Biochem. and Biophys. Res. Comm. 47, nº 6, 1322-1331.
- CARNEVALI, F., MORPURGO, G. and TECCE, G. 1968. - "Density changes of cytoplasmic DNA from petite mutants of Saccharomyces cerevisiae and a hypothesis on the mechanism of mutation". Gior. Bot. Ital. 102 , 231-237.
- CARNEVALI, F., MORPURGO, G. and TECCE, G. 1969. - "Cytoplasmic DNA from petite colonies of Saccharomyces cerevisiae; a hypothesis on the nature of the mutation". Science 163 , - 1331-1333.
- CLARK-WALKER, G. D. 1972. "Isolation of circular DNA from a mitochondrial fraction from yeast" . Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 69, 388-392.
- CLARK-WALKER, G. D. and LINNANE, A. W. 1966. "In vivo differentiation of yeast cytoplasmic and mitochondrial protein synthesis with antibiotics" Biochem. and Biophys. Res. Comm. 25, 8-13.

- CLARK-WALKER, G.D. and GABOR MIKLOS, G.L. 1974.  
 "Mitochondrial genetics, circular DNA -  
 and the mechanism of the petite mutation in  
 yeast". Genet. Res. Camb. 24, 43-57.
- COEN, D., DEUTSCH, J., NETTER, P., PETROCHILLO, E.  
 and SLONIMSKI, P.P. 1970. "Mitochondrial  
 genetics. I. Methodology and phenomenolo -  
 gy." En "Control of organelle development"  
 Soc. Exp. Biol. Symp. 24. ed. P.L. Miller, New  
 York. Academic 524 pp. 449-496.
- CHEN, S.J., EPHRUSSI, B. and HOTTINGER, H. 1950. -  
 "Nature genetique des mutants à deficiéncé  
 respiratoire de la souche B-11 de la levure  
 de boulangerie". Heredity 4, 337-351.
- EPHRUSSI, B. 1953 "Nucleo-cytoplasmic relations in mi -  
 croorganism". Clarendon Press. Oxford. -  
 England.
- EPHRUSSI, B., GRANDCHAMP, S. 1965. "Etudes sur la su -  
 ppressivite des mutants à deficiéncé respira -  
 toire de la levure. I. Existence au cellulaire  
 de divers "degrés des suppressivité". Here -  
 dity, 20, 1-7.
- EPHRUSSI, B., HOTTINGUER, H. 1951. "Cytoplasmic cons -  
 tituents of heredity. On an unstable cell sta -  
 te in yeast". Cold. Spring Harbor Symp. Quant  
 Biol. 16, 75-84.

- EPHRUSSI, B., HOTTINGUER, H. et CHIMENES, A.M. 1949a  
 "Action de l'acriflavine sur les levures. I.  
 La mutation "petites colonie". Ann. Inst. Pas  
teur 76, 351-367.
- EPHRUSSI, B., HOTTINGUER, H.; et TAVLITZKI, J. 1949b.  
 "Action de l'acriflavine sur les levures. II.  
 Etude genetique du mutant "petite colonie".  
 Ann. Inst. Pasteur. 76, 419-450.
- EPHRUSSI, B., JACOB, H. et GRANDCHAMP, S. 1966. 'Etudes  
 sur la suppressivité des mutants à deficiencia  
 respiratoire de la levure. II. Etapes de la -  
 mutation grande en petite provoquée par le  
 facteur suppressif". Genetics 54, 1-29.
- EPHRUSSI, B., MARGERIE-HOTTINGUER, H. et ROMAN, H.  
 1954. "Sur le comportement genetique des  
 mutants à deficiencia respiratoire de la le-  
 vure". 8<sup>eme</sup>. Congres Int. Bot. 111-120.
- EPHRUSSI, B., MARGERIE-HOTTINGUER, H. et ROMAN, H.  
 1955. "Suppressiveness: a new factor in the  
 genetic determinism of the synthesis of res-  
 piratory enzymes in yeast". Proc. Nat. Acad.  
 Sci. U. S. 41, 1065-1071.
- FOWELL, R. R. 1969a. "Sporulation and hybridization of yeast"  
 en "The yeast ". ed. A. H. Rose and J. S. Ha-  
 rrisson. Academic Press. New York. 1969, vol.  
1, pp. 303-376.

- FOWELL, R. R. 1969b. en "The Yeast" ed. A. H. Rose and J. S. Harrison, Academic Press. New York. 1969. Vol. 1, p. 358.
- FOWELL, R. R. 1969c. en "The Yeasts". ed. A. H. Rose and J. S. Harrison. Academic Press. New York. 1969. Vol. 1, p. 375.
- GAUSE, G. F., KOCHETKOVA, G. V. and VLADIMIROVA, G. B. 1957. "On the biochemical mutant of yeast - with impaired respiration". Ddoklady Akad. Nauk, S. S. S. R. 117, 138-141.
- GOLDRING, E. S., GROSSMAN, L. I., KRUPNIN, D., CRYER, D. R. and MARMUR, J. 1970a. "The ethidium bromide (E. B.) induced breakdown of yeast mitochondrial DNA (mDNA) during induction of petites". Fed. Proc. 29, 2710.
- GOLDRING, E. S., GROSSMAN, L. I., KRUPNIK, D., CRYER, D. R. and MARMUR, J. 1970 b. "The petite-mutation in yeast: loss of mitochondrial deoxyribonucleic acid during induction of petites with ethidium bromide". J. Mol. Biol. 52, 323-335.
- GONZALEZ MUÑOZ, M. T. 1974. "Estudios sobre la supresividad de mutantes  $\rho^-$  de Saccharomyces cerevisiae". Tesis doctoral de la Universidad de Granada.



- GONZALEZ MUÑOZ, M. T. and MONTOYA, E. 1975. "Factores que afectan el poder supresor de mutaciones  $q^-$  de Saccharomyces cerevisiae". Abstract.
- GONZALEZ MUÑOZ, M. T. and MONTOYA, E. 1976. "Biological role of suppressiveness in yeast". Microbios Letters 2, 213-217.
- HAEFNER, K. 1965. En "The Yeasts" ed. A. H. Rose and J. S. Harrison. Academic Press. New York. 1969. vol. 1, p. 375.
- HOLLEMBERG, C. P., BORST, P. and BRUGGEN, E. F. van, 1972. "Mitochondrial DNA from cytoplasmic petite mutants of yeast. Biochim. Biophys. Acta 277, 35-43.
- LACHOWICZ, T. M., KOTILAK, Z., KOLODINSKI, J. and SNIEGOCKA, Z. 1969. "New types of respiratory deficient mutants in Saccharomyces cerevisiae. II. Physiology and genetics of a series of segregational mutants induced by ultraviolet irradiation or nitrous acid treatment". Arch. Imm. et Thera. Exp. 17, 72-85.
- LEIBOWITZ, M. J., and WICKNER, R. B. 1976. "A chromosomal gene required for killer plasmid expression, mating, and sporulation in Saccharomyces cerevisiae". Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 73, 2061-2065.

- LERMAN, L. S. 1961. "Structural considerations on interaction of deoxyribonucleic acid and acridines" J. Mol. Biol. 3, 18-30.
- LINDEGREN, C. C. 1956. "Mutation and other variations in microorganisms". Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg. Ser. Physiol. 26, 256-271.
- LINDEGREN, C. C., NAGAI, S. and NAGAI, H. 1958. "Induction of respiratory deficiency in yeast by manganese, copper, cobalt and nickel". Nature, 182, 446-448.
- MARCOVICH, H. 1953. "Rapports entre la structure des acridines et leur activite en tant qu'agents inducteurs des mutants respiratoires chez la levure". Ann. Inst. Pasteur, 85, 199-216.
- MEHROTRA, B. D., MAHLER, H. R. 1968. "Characterization of some unusual DNA's from certain "petite" strains Saccharomyces cerevisiae". Arch. - Biophys. 128, 685-703.
- MICHAELIS, G., DOUGLAS, S., TSAI, M. J., CRIDDLE, R. S. 1971. "Mitochondrial DNA suppressiveness of petite mutants in Saccharomyces cerevisiae". Biochem. Genetics. 5, 487-495.
- MOAT, A. G., PETERS, N., Jr. and SBR, A. M. 1959. "Selection and isolation of auxotrophic yeast mutants with the aid of antibiotics" J. Bacteriol. 77, 673-677.

- MOUNOLOU, J. C., JACOB, H., SLONIMSKI, P. P. 1966. "Mitochondrial DNA from yeast "petite" mutants: specific changes of buoyant density corresponding to different cytoplasmic mutations". - Biochem. Biophys. Res. Comm. 24, 218-224.
- NAGAI, S. 1955. "Sur la reduction du chlorure de triphenil tetrazolium par les levures". Compt. Rend. Soc. Biol. 149, 2047-2050.
- NAGAI, S. 1959. "Induction of respiration deficient mutation - in yeast by various synthetic dyes". Science 130, 1188-1189.
- NAGAI, S. 1963a. "Diagnostic color differentiation plates for hereditary respiration deficiency in yeast". J. Bacteriol. 86, 299-302.
- NAGAI, S. 1963b. "Methylene blue and toluidine blue interfering with the production of respiration-deficient mutants in yeast by acriflavine". Experimental Cell. Res. 29, 82-85.
- NAGAI, S. 1969. "Production of respiration-deficient mutants - in yeast by a carcinogen, 4-nitroquinoline 1-oxide". Mutation Res. 7, 333-337.
- NAGAI, S., YANAGISHIMA, N, and NAGAI, H. 1961. "Advances in the study of respiration-deficient (RD) mutation in yeast and other microorganisms". Bact. Rev. 25, 404-426.

- NAGLEY, P., LINNANE, A.W. 1970. "Mitochondrial DNA deficient petite mutants of yeast". Biochem. Biophys. Res. Comm. 30, 989-996.
- NAGLEY, P. and LINNANE, A.W. 1972. "Biogenesis of mitochondria. XXI. Studies on the nature of mitochondrial genome in yeast: the degenerative effects of ethidium bromide on mitochondrial genetic information in a respiratory competent strain". J. Mol. Biol. 66, 181-193.
- NUÑEZ DE CASTRO, I. 1972. "Regulación de L-glutamato deshidrogenasas ( $\text{NAD}^+$  y  $\text{NADP}^+$ ) en Saccharomyces cerevisiae". Tesis doctoral. Universidad de Granada.
- OGUR, M., LINDEGREN, G. and LINDEGREN, C.C. 1954. "A simple screening test for genetic studies of respiration deficiency in yeast". J. Bacteriol. 68, 391-392.
- OGUR, M. and St. JOHN, R. 1956. "A differential and diagnostic plating method for population studies of respiration deficiency in yeast". J. Bacteriol. 72, 500-504.
- OGUR, M., St. JOHN, R., and NAGAI, S. 1957. "Tetrazolium - overlay technique for population studies of respiration deficiency in yeast". Science 125, 928-929.

- OGUR, M., St. JOHN, R., OGUR, S. and MARK, A.M. 1959. "The direct estimation of mutation rate from mutant frequency under special conditions". Genetics 44, 483-496.
- OKAZAKI, T., and KORNBERG, A. 1964. "Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. XV. Purification and properties of polymerase from Bacillus subtilis" J. Biol. Chem. 239:259-268.
- PINTO DA COSTA, S.O. and BACILA, M. 1973. "Induction of respiratory-deficient non-chromosomal "petites" of S. cerevisiae by sodium dodecyl sulfate". J. Bacteriol. 115, 461-463.
- PRUNELL, A., and BERNARDI, G., 1974. "The mitochondrial genome of wild-type yeast cells." J. Mol. Biol. 86, 825-841.
- RADLOFF, R., BAUER, W., VINOGRAD, J. 1967. "A dye-bouyant density method for the detection and isolation of closed circular duplex DNA: the closed circular DNA in hela cells". Biochemistry 57, 1514-1521.
- RANK, G.H., and PERSON, C. 1969. "Reversion of spontaneously arising respiratory deficiency in Saccharomyces cerevisiae." Can. J. Genet. Cytol. 11, 716-728.
- RAUT, C. 1953. "A cytochrome deficient mutant of Saccharomyces cerevisiae". Exptl. Cell. Research. 4, 295-305.
- RAUT, C. 1954. "Heritable non-genic changes in yeast by ultraviolet light". J. Cell. Comp. Physiol. 44, 463-475.

- REILLY, C. and SHERMAN, F. 1965. "Glucose repression of cytochrome a synthesis in cytochrome-deficient mutants of yeast. " *Biochem. Biophys. Acta*, 95, 640-651.
- ROUSSEAU, P. and HALVORSON, H.O. 1969. "Preparation and storage of single spores of Saccharomyces cerevisiae " *J. Bacteriol.* 100, 1426-1427.
- SARACHEK, A. 1958. "The induction by ultraviolet radiation and the photoreactivation of heritable respiratory deficiency in Saccharomyces adapted and unadapted to aerobic respiration". *Cytologia* 23 143-158.
- SCHACHMAN, H.K., ADLER, J., RADDING, G.M., LEHMAN, I. R. and KORNBERG, A. 1960. "Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. VII. Synthesis of a polymer of deoxyadenylate and deoxythymidylate. " *J. Biol. Chem.* 235: 3242-3249.
- SCHWARTZ, G. 1959. "Der einfluss von langfarbungen mit - acridinorange auf die eutwicklung von Saccharomyces cerevisiae " (Hansen) Bissertation. Tech. Hochschule Branunschweig, W. Germany.
- SHERMAN, F. 1957. "The heat inactivation and production of cytochrome deficiency in yeast". *Exptl. Cell. - Res.* 11, 659-660.

- SHERMAN, F. 1958. "A study of the effects of elevated temperatures on the growth and inheritance of Saccharomyces cerevisiae" Thesis. UCRL 8573 University of California, Berkeley.
- SHERMAN, F. 1959. "The effects of elevated temperatures on yeast". J. Cell. Comp. Physiol. 54, 29-52.
- SHERMAN, F. 1963. "Respiration-deficient mutants of yeast". I. Genetics". Genetics 48, 375-378.
- SHERMAN, F. and EPHRUSSI, B. 1962. "The relationship between respiratory deficiency and suppressiveness in yeast as determined with segregational mutants" Genetics 47, 695-700.
- SHERMAN, F. and SLONIMSKI, P. P. 1964. "Respiration-deficient mutants of yeast. II. Biochemistry." Biochem. Biophys. Acta 90, 1-15.
- SLONIMSKI, P. P. 1949. "Action de l'acri flavine sur les levures. IV. Mode d'utilisation du glucose par les mutants "petite colonie". Ann. Inst. Pasteur. 76, 510-530.
- SLONIMSKI, P. P. 1953. "A specific relation between enzymic adaptation and cytoplasmic mutation". Symp. Soc. Gen. Microbiol. 3. 76-97.
- SLONIMSKI, P. P. 1968. "Discussion. Round table discussion on biochemical aspects of the biogenesis of mitochondria". En "Biochemical aspects of the biogenesis

- of mitochondria". Ed. E. C. Slater, J. M. Tager, S. Pappa, E. Quagliariello, Itali: Adriatica, pp. 475-478.
- SLONIMSKI, P. P. et EPHRUSSI, B. 1949. "Action de l'acri-  
flavine sur les levures. V. Le systeme des cyto-  
chromos des mutants "petite colonie". Ann. Inst.  
Pasteur. 77, 47-63.
- SLONIMSKI, P. P., PERRODIN, G., and CROFT, J. H. 1968.  
"Ethidium bromide induced mutation of yeast mi-  
tochondria: complete transformation of cells in-  
to respiratory deficient non-chromosomal "pe-  
tites". Biochem. Biophys. Res. Comm. 30, 233-  
239.
- SUGIMURA, T., OKABE, K., KODAMA, M. 1969. "Induction -  
of respiration-deficient mutant of Saccharomy -  
ces cerevisiae by pinacianol.". J. Bacteriol. 97  
964-965.
- TAVLITZKI, J. 1949. "Action de l'acri-flavine sur les levures.  
III. Etude de la croissance des mutants "petite -  
colonie". Ann. Inst. Pasteur. 76, 497-509.
- THOMAS, D. Y., and WILKIE, D. 1969. "Inhibition of mitochon-  
drial synthesis in yeast by eritromycin: cyto-  
plasmic and nuclear factor controlling resistan-  
ce". Genet. Res. 11, 33-41.



- THOMAS, D. Y. and WILLIAMSON, D. H. 1971. "Products of mitochondrial protein synthesis in yeast". *Nature new Biology*, 233, 196-199.
- WARING, M. J. 1968. "Drugs which affect the structure and function of DNA". *Nature* 219, 1320-1325.
- WAXMAN, M. F. and EATON, N. R. 1974. "Nuclear factors and the control of suppressiveness in petite mutants of Saccharomyces cerevisiae". *Molec. Gen. Genet.* 133, 37-47.
- WEISLOGEL, P. O., and BUTOW, R. A. 1970. "Low temperature and chloramphenicol induction of respiratory deficiency in a cold sensitive mutant of Saccharomyces cerevisiae". *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 67. 52-58.
- WICKERHAM, L. J. 1946. "A critical evaluation of the nitrogen assimilation test commonly used in the classification of yeast". *J. Bacteriol.* 52, 299-301.
- WICKNER, R. B. 1976. "Killer of Saccharomyces cerevisiae: a double stranded ribonucleic acid plasmid". *Bacteriol. Rev.* 40, no 3, 757-773.
- WILD, G. and HINSELWOOD, C. 1956. "The response of yeast cells to the action of inhibitory substances". *Proc. Roy. Soc. (London)* B145, 14-41.
- WILKIE, D. 1970. "Reproduction of mitochondria and chloroplast". *Symposia of the Society General Microbiology.* 20, 381-399.

- WILKIE, D., SAUNDERS, G. and LINNANE, A.W. 1967. "Inhibition of respiratory enzyme synthesis in yeast by chloramphenicol tolerance and resistance to other antibacterial antibiotics". Gen. Res. Camb. 10, 199-203.
- WRIGHT, R. and LEDERBERG, J. 1957. "Extranuclear transmission in yeast heterokaryons". Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 43, 919-923.
- YANAGISHIMA, N. 1956. "On the W variant of yeast with special reference to its appearance and character". J. Inst. Polytech. Osaka City Univ. Ser. D 7, 131-146.
- YANAGISHIMA, N. 1964. "Induction by auxin of respiratory deficiency in yeast". Plant. and Cell Phys. 5, 316-364.
- YCAS, M. 1956. "A hereditary cytochrome deficiency appearing in yeast grown at an elevated temperature". Expl. Cell. Res. 11, 1-6.
- YOTSUYANAGI, Y. 1962. "Etudes sur le chondriome de la levure. II. Chondriomes des mutants a deficiencie respiratoire". J. Ultrastruct. Res. 7, 141-158.